

**Untersuchungen über die Wirkung von Stoffwechselprodukten, insbesondere  
Auxinen, des wachstumsfördernden Rhizobakteriums (PGPR) *Bacillus subtilis*  
auf die pflanzliche Salztoleranz**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum horticulturnarum**

**(Dr. rer. hort.)**

eingereicht an der

Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät

von

Dipl. Agrar- und Gartenbauingenieur

**Archontia Stavropoulou**

geboren am 27. Februar 1971 in Serres

Dekan: Prof. Dr. Uwe Jens Nagel

Gutachter: 1. Prof. em. Dr. Dr. h. c. Helmut Bochow

2. Dr. Klaus-Dieter Hentschel

3. Dr. agr. habil. Bernd Freier

Datum der mündlichen Prüfung: 15.07.2005

## Summary

Stavropoulou, Archontia: **Studies about the action of metabolites, especially auxins, of the growth-promoting rhizobacterium (PGPR) *Bacillus subtilis* on the plant salt tolerance**

102 pages, 33 figures, 13 tables

Humboldt University of Berlin, Faculty of Agriculture and Horticulture, Ph. D. thesis

To find out the mode of tolerance increasing action against salinity of the plant root colonizing PGPR *Bacillus subtilis*, bacterial metabolites of the strains FZB24 and FZB41 were studied in the test plant tomato under the influence of high salinity.

Because the culture filtrate of the fermentative transitionphase with the whole range of produced metabolites by *B. subtilis* showed to a certain extent a tolerance increasing action at dilution of 0,1 % in axenic plant growth tests with the parameters length, fresh mass and dry mass of shoots and roots as well as foliage area after 7 days treatment of tomato seedlings and subsequent cultivation under high salt stress, it has been fractionated with adsorber resin and HPLC. These fractions, as well as fractions from the culture filtrate after 19 h fermentation were tested also by tomato seedlings in axenic culture. Fractions with different proteins and peptides, which were produced by *B. subtilis*, showed partly activities also depending of concentration with regard to the plant growth stimulation and at the same time tolerance increase against salt stress. Following also a peptide extract from *B. subtilis* with special concentrated peptides was examined in the axenic plant test system, showing similarly a visible action depending of concentration.

In the same axenic test system there were tested further auxin precursors and auxin itself, which are known metabolites of *B. subtilis*, on tomato seedlings both by root treatment and leaf treatment. Additionally was studied the action of auxins on the water content of the seedlings under salt stress, as well as on the adventitious root formation with parameters rate of rooting, root number and root length of hypokotyl segments from etiolated tomato seedlings, in presence and absence of salinity. Finally it was studied the uptake and transport of auxins in segments of stems from etiolated tomato seedlings in presence and absence of salinity by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Lastly it was tested the action of auxins on plant growth with calculations of the fresh and dry mass of shoots and roots, length of shoots and foliage area, as well as of water content in a tomato hydroponic cultivation under greenhouse conditions and salt stress.

The results show that particularly auxin precursors and partly auxin as metabolites of *B. subtilis* can induce an increase in the salt stress tolerance of the test plant tomato, although the action on the plant salt tolerance was differentiated and variable in its extent.

The existing effect firstly of the auxin precursors is discussed as obviously main mechanism for the plant growth stimulating and at the same time tolerance increasing action of the rhizobacterium against salinity by root colonization and interaction with the plant metabolism.

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1    Salzstress bei Pflanzen	3
2.2 <i>Bacillus subtilis</i> als PGPR	7
2.2.1    Wurzeffekte von <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.2.2    Stoffwechselprodukte von <i>Bacillus subtilis</i>	10
<b>3 Aufgabenstellung der Arbeit – Untersuchungen</b>	<b>14</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
4.1    Pflanzenmaterial und Anzucht	15
4.2    Stoffwechselprodukte von <i>Bacillus subtilis</i>	19
4.3    Bestimmung der Prüfparameter	23
4.4    Statistische Auswertung	26
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>28</b>
5.1    Axenische Kultur mit Kulturfiltrat von FZB24	28
5.2    Axenische Kultur mit Kulturfiltrat-Fraktionen von FZB24	30
5.3    Axenische Kultur mit Peptidextrakt von FZB41	38
5.4    Axenische Kultur mit Auxinen	40
5.5    Sprosskultur mit TRP, IPyA, IAAld und IAA	54
5.6    Sprosskultur mit IPyA und IAA	60
5.7    Gewächshauskultur	62
<b>6 Diskussion</b>	<b>69</b>
6.1    Wirkung des Kulturfiltrats	69
6.2    Wirkung von Proteinen und Peptiden	71
6.3    Wirkung von Auxinen	73
6.4    Pflanzliche Anpassungsmöglichkeiten an Salzstress	81
<b>7 Schlussfolgerungen</b>	<b>83</b>
<b>8 Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
<b>9 Verzeichnisse</b>	<b>86</b>
9.1    Literaturverzeichnis	86
9.2    Abkürzungsverzeichnis	97
9.3    Tabellenverzeichnis	99
9.4    Abbildungsverzeichnis	100

## 1 Einleitung

Pflanzen werden oft von Pathogenen infiziert bzw. von Insekten befallen und die Vielfalt der Signale, die durch diesem biotischen und andererseits abiotischen Stress, wie Trockenheit, hohe Salinität und Nährstoffmangel erzeugt werden, kann intensive Auswirkungen auf die Wirksamkeit ihrer Resistenzmechanismen haben. Abiotische Stressoren können die Prädisposition von Pflanzen gegenüber Krankheiten und Schädlingen erhöhen, durch systemische Veränderung der Pflanzenphysiologie mit negativen Auswirkungen auf die Resistenz (BOSTOCK et al. 2001).

Der biotische Stress bei Pflanzen kann durch chemische, physikalische oder biologische Bekämpfungsmaßnahmen gegen die Schaderreger unterdrückt werden, und durch Erhöhung der pflanzlichen Resistenz gegen die Stressfaktoren, also der grundsätzlichen Befähigung eines Organismus den Angriff eines Pathogens bis zu einem bestimmten Grad abzuwehren oder der Wirkung eines Stressors zu widerstehen (AUST et al. 1993). Eine Erhöhung der pflanzlichen Toleranz, der Fähigkeit der Pflanzen Pathogenbefall oder die Einwirkung abiotischer Stressoren unter geringerer Einbuße an Lebensfähigkeit und Produktivität zu überstehen, besser als eine sensible Pflanze bei gleicher Belastungsintensität (AUST et al. 1993), ist gegen biotischen Stress unvorteilhaft, da sich die organismischen Schaderreger weiter vermehren können. Dem abiotischen Stress, der durch Trockenheit, Versalzung, extreme Witterung und andere chemische oder physikalische Stressoren verursacht wird, kann dagegen praktisch alleinig nur durch Erhöhung der Resistenz oder der Toleranz gegen die Stressfaktoren entgegengewirkt werden. Allerdings sind gezielte Maßnahmen gegen abiotischen Stress bzw. Schadfaktoren, im Vergleich zum Pflanzenschutz vor biotischem Stress, weit weniger erforscht und entwickelt.

Zu den wichtigsten abiotischen Schadfaktoren gehört die Versalzung, die Anreicherung von wasserlöslichen Salzen in Böden oder Bodenhorizonten (SCHACHTSCHABEL et al. 1998). Salzprobleme treten hauptsächlich in semiariden und ariden Regionen auf, mit jährlichen Niederschlagsmengen unter 500 mm und hohen Evaporationsraten, wo die Salze mit dem kapillaren Wasseraufstieg in die oberen Bodenschichten transportiert und dort abgelagert werden. Diese Gebiete nehmen 55 % der festen Erdoberfläche ein (HAJ-BAKRI 1996). Die Versalzung oder Salinität zählt zu den ältesten Problemen der „Bodenverschmutzung“ und obwohl die zugrundeliegenden Probleme und ihr Management bekannt sind, unterliegt etwa ein Drittel des weltweit bewässerten Landes durch Salinität der Degradation (ROWELL 1997). In Gebieten der alten Welt, wie Mesopotamien, ist der Salzgehalt stellenweise metertief auf mehrere Gewichtsprozent des trockenen Bodens angestiegen aufgrund der Jahrtausende währenden Kultivierung dieser Flächen. Solche Böden sind teilweise zu sekundären Salzwüsten degeneriert und können nicht mehr pflanzenbaulich genutzt werden.

Auch neu erschlossene Bewässerungsgebiete sind vor Versalzung nicht geschützt, wenn Drainage aus Wassermangel oder topographischen Gegebenheiten nicht möglich ist. Oder natürliche Drainage fehlt, wie z. B. im Niltal, wo der Staudammbau das Ausbleiben der periodisch auswässernden Nilfluten verursacht. Bodenversalzungen sind dort ein akutes Problem (KREEB 1996).

Die Züchtung von salzresistenten Sorten, die Entwicklung eines geeigneten Drainagesystems und verschiedene Kultivierungsmaßnahmen zur Erhöhung der Toleranz gegen Salinität sind die heute vorrangig beschrittenen Wege zur Minderung von Salzstress auf Kulturpflanzen.

In neuerer Zeit gewinnen zunehmendes Interesse auch Möglichkeiten einer biologischen Stresstoleranzerhöhung durch den Einsatz von nützlichen Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis*. So belegen Untersuchungen von ZIMMER et al. (1999) und BOCHOW et al. (2001a) eine Wachstumsförderung der mit diesem Rhizobakterien-Typ behandelten Pflanzen und eine offenbare Induktion von Resistenz und/oder Toleranz gegenüber Salzstress.

*B. subtilis* ist ein PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) das seit einigen Jahren in unterschiedlichen Präparaten erfolgreich angewendet wird (KLOEPPER 2004) und bemerkenswerte Wirkungen bei der Reduzierung bodenbürtiger pilzlicher Pflanzenpathogene, wie z. B. *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* und Bakterien wie *Streptomyces scabies* und *Erwinia carotovora* zeigte. Diese, biotischen Stress unterdrückende Wirkungen von *B. subtilis* konnten in vielen Kulturen nachgewiesen werden, wie Kartoffel und Gemüsearten, Getreide und Zierpflanzen. Dabei wurde nach Applikation und Wurzelkolonisation auch eine erhöhte Krankheitsresistenz nachgewiesen, die vielfach mit der Reduzierung des Pathogenbefalls verbunden ist. In einer Reihe von Versuchsanstellungen mit Pflanzen und Pathogenen, ließ sich auch eine erhöhte Toleranz beobachten, mit Ausgleichung von Verlusten bzw. Schadstressminderungen ohne merkliche Reduzierung des Pathogens. In allen Fällen führte dabei die Applikation des Rhizobakteriums zur Stimulierung des pflanzlichen Wachstums und zu höheren Erträgen (BOCHOW 1995), als offensichtlichen Ausdruck gesteigerter Fitness der Pflanzen.

Mit der vorliegenden Arbeit soll Einblick in die Wirkungsweise der neuerlich festgestellten Salztoleranzerhöhung bei Pflanzen durch Anwendung von *B. subtilis* gewonnen werden. Stoffwechselprodukte des Bakteriums aus den Kulturfiltraten mit besonderem Augenmerk auf pflanzenwachstumsfördernde Substanzen (Phytohormon Auxin und Präkursoren), werden in ihrer Wirkung auf salzgestresste Tomatenpflanzen als Testobjekt untersucht.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Salzstress bei Pflanzen

Aufgrund ihrer Reaktion auf hohe Salzkonzentrationen werden die Pflanzen in zwei Gruppen untergliedert. Halophyten bzw. „Salzpflanzen“ wachsen auf natürlichen Salzböden und schließen ihren gesamten Lebenszyklus dort ab, während Glykophyten bzw. „Süßpflanzen“ deutlich weniger Salz tolerieren. Meistens reagieren glykophytische Pflanzen oberhalb einer Schwellenkonzentration von Salz mit Verminderung des Wachstums, Abnahme der Trockenmasse und Blattverfärbung (TAIZ und ZEIGER 2000). Extreme Salzbelastung führt zu Hemmung des Spross- und Wurzelwachstums, Abnahme der Blattfläche, Abschwächung und Verspätung des Austriebs von Knospen und Wurzel-, Knospen-, Blattrand- und Sprossspitzennekrosen, sowie Vertrocknung ganzer Sprossbereiche. Widerstandsfähige Arten sind einerseits vor unmittelbarer Salzschädigung besser geschützt, andererseits werden Wachstum und Ertrag bei ihnen weniger beeinflusst als bei empfindlichen Arten (LARCHER 1994). Die Testpflanze Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), eine der wichtigsten und meist verbreiteten Kulturpflanzen in der Welt, ist ein Glykophyt und wird vorwiegend im Mittelmeerraum kultiviert, wo Salinität ein fortschreitendes Problem ist. Sie wurde von MAAS und HOFFMANN (1977) und MAAS (1986) als mäßig empfindlich gegenüber Salzstress klassifiziert.

Hohe  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen im apoplastischen Raum führen zu Veränderungen des thermodynamischen Gleichgewichts von Wasser und Ionen mit hyperosmotischem Stress, ionischem Ungleichgewicht und Toxizität als Folgen (NIU et al. 1995).  $\text{Na}^+$ -Toxizität repräsentiert den größten ionischen Stress in Verbindung mit hoher Salzbelastung, obwohl manche Pflanzen auch gegenüber  $\text{Cl}^-$  empfindlich sind, das hauptsächliche Anion in salzhaltigen Böden.  $\text{Na}^+$  hat eine stark hemmende Wirkung auf die Aktivität vieler Enzyme, die bei hohem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Verhältnis ausgeprägter ist. (XIONG und ZHU 2004). Über die Wirkung hoher  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen ist wenig bekannt, da sie meistens mit allgemeinen Salzschädigungen auftreten, werden aber in Verbindung gebracht mit einem physiologischen  $\text{K}^+$ -Mangel (HAJ-BAKRI 1996). Der alkalische pH-Wert von Salzböden hat teilweise, zusätzlich zu der Ionentoxizität, negative Folgen auf das pflanzliche Wachstum. Das niedrige osmotische Potenzial der salzhaltigen Lösungen hemmt die Wasseraufnahme der Pflanzen und führt dadurch zu „physiologischer Trockenheit“. Für Halophyten, die tolerant gegenüber  $\text{Na}^+$ -Toxizität sind, könnte osmotischer Stress der wichtigste Grund der Wachstumshemmung sein. Oxidativer Stress kann als sekundärer Stress bei Pflanzen durch hohe Salinität neben der Akkumulation von toxischen oder unerwünschten Substanzen und Störungen der Ernährung, sowie des zellulären Metabolismus ausgelöst werden und ist eine bedeutende Einschränkung für die pflanzliche Salztoleranz (XIONG und ZHU 2004). Das

belegen auch die Untersuchungen von MITTOVA et al. (2002) bei der kultivierten Tomate und der verwandten salztoleranten Art *Lycopersicon pennellii* nach Exposition in 100 mM NaCl. Sie zeigen, dass *L. pennellii* zwar keine vererbte Toleranz gegenüber oxidativen Stress besitzt, durch die Hinaufregulation des antioxidativen Systems aber toleranter wird gegenüber salzinduziertem oxidativen Stress. Und auch die Untersuchungen von DELUMEAU et al. (2000) bei der Tomate und der salztoleranten Art *Lycopersicon pimpinellifolium* unterstreichen die erheblichen Auswirkungen des oxidativen Stress auf die Salztoleranz von Pflanzen. SHALATA und NEUMANN (2001) berichten, dass der Zusatz von Ascorbinsäure in einer mit 300 mM NaCl angereicherten Nährlösung die Überlebensrate von Tomatensämlingen von 0 % auf ca. 50 % ansteigen ließ. Die Anwendung von Ascorbinsäure führte zu einer Verminderung der Akkumulation von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen, ein Maß für den oxidativen Stress, in Wurzel-, Spross- und Blattgewebe, ein Hinweis auf die schützende Wirkung von Vitamin C gegenüber salzinduzierter Lipidperoxidation durch aktive Sauerstoffverbindungen.

Nach XIONG und ZHU (2004) ist die Abnahme des zellulären  $K^+$ -Gehaltes bei Salzbelastung ein generelles Phänomen, das verantwortlich sein kann für die Wachstumsreduzierung und die verminderte Vitalität der Pflanzen. Aufgrund der ähnlichen physikochemischen Eigenschaften von  $Na^+$  und  $K^+$  haben hohe  $Na^+$ -Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die  $K^+$ -Aufnahme in der Wurzel, und können so zu gestörter  $K^+$ -Ernährung der Pflanzen führen, die von entscheidender Bedeutung ist für die Aufrechterhaltung des Turgors und des Membranpotentials und die Aktivität vieler Enzyme. Das ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von RUS et al. (2001), die durch Expression des *HAL1* Gens, das in Hefen die  $K^+/Na^+$  Selektivität erleichtert und die zelluläre Salztoleranz erhöht, die salzinduzierte Ertragsreduzierung in Tomatenpflanzen minimieren konnten.

Darüber hinaus können die physiologischen Veränderungen, die bei Pflanzen durch Exposition zu Salzbedigungen induziert werden, auch zu Ertragsminderungen führen. Die Untersuchungen von MAVROGIANOPOULOS et al. (2002) zeigen, dass ein hoher, das ganze Wurzelsystem von Tomatenpflanzen belastender Salzstress, eine Ertragsreduzierung aufgrund des niedrigen Wassergehaltes der Früchte herbeiführt, was auf eine osmotische Regulierung zurückzuführen ist. Bei Pflanzen mit geteiltem Wurzelsystem, deren eine Hälfte reines Wasser und die andere salzhaltige Nährlösung (100 mM NaCl) aufnimmt, wurde eine Ertragsabnahme beobachtet, die auf einer Hemmung der Fruchttrockenmasse basiert, was auf einen Mangel an osmotischer Anpassung hinweist. Die durch NaCl induzierte physiologische Stressreaktionen in Tomatenfrüchten waren Gegenstand der Untersuchungen von BALIBREA et al. (1999a). Die Ertragsminderungen in Tomatenpflanzen unter dem Einfluss von NaCl beruhen vorwiegend auf einer Abnahme der Akkumulationsrate

der Trockenmasse während der frühen Wachstumsphase der Frucht, 15-35 Tage nach der Anthese. Eine partielle Wiederherstellung des Wachstums trat jedoch während der späten Phase der Fruchtentwicklung ein, 35-45 Tage nach der Anthese. Der Salzstress bewirkte eine Saccharoseakkumulation im apoplastischen und symplastischen Raum bis 15 mM, eine Ansäuerung und  $\text{Na}^+$ -Akkumulation im Apoplast, sowie eine vorübergehende Erhöhung des Stärkegehaltes. Die Abnahme des apoplastischen pH-Wertes führte zu einer Aktivitätsverminderung der unlöslichen sauren Invertase, was in Zusammenhang mit der Saccharoseakkumulation gebracht wurde und in einem limitierenden Schritt für das Fruchtwachstum unter mäßigen (70 mM) und hohen (150 mM) Salzbedingungen resultierte.

Außerdem kann Salinität speziell bei Tomatenpflanzen negative Folgen auf die Fruchtqualität haben, durch Erhöhung der Prädisposition gegenüber Blütenendfäule (BER). BROWN und HO (1993) untersuchten die Aufnahme und Verteilung von  $\text{Ca}^{++}$  bei abgetrennten Tomatenfrüchten von Sorten mit unterschiedlicher Anfälligkeit gegenüber BER, eine physiologische Störung der Tomate, die in Verbindung mit einem lokalisierten  $\text{Ca}^{++}$ -Mangel im distalen Teil der Frucht gebracht wird. Der basipetale IAA-Abfluss aus abgetrennten Früchten wurde gleichzeitig mit der  $\text{Ca}^{++}$ -Aufnahme ermittelt, um eine mögliche Beteiligung von IAA in der  $\text{Ca}^{++}$ -Aufnahme oder der BER-Häufigkeit zu erforschen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Prädisposition der Pflanzen gegenüber BER und die  $\text{Ca}^{++}$ -Aufnahme und Verteilung innerhalb der Frucht oder den IAA-Abfluss aus der Frucht ermittelt werden. Es wird jedoch eine Beteiligung von IAA in der Xylementwicklung in Verbindung mit BER vermutet. Nach DORAIS et al. (2001) wird die Anfälligkeit von Tomatenfrüchten gegenüber BER auf einen Koordinationsmangel zwischen beschleunigter Zellstreckung und unzulänglicher  $\text{Ca}^{++}$ -Versorgung aufgrund von mangelnder Xylementwicklung in der Frucht zurückgeführt. Eine Erhöhung des Salzgehaltes durch Zusatz von NaCl in der Nährlösung führt bei Tomatenfrüchten zu Erhöhung der BER-Häufigkeit und des  $\text{Na}^+$ -Gehaltes, sowie Abnahme der Größe, des  $\text{K}^+$ - und N-Gehaltes und der Konzentration von titrierbaren Säuren. Durch Anpassung der Klimafaktoren im Gewächshaus, wie Temperatur, rel. Luftfeuchte und  $\text{CO}_2$ -Gehalt kann den negativen Folgen der hohen Salzbelastung auf den Ertrag und die Fruchtqualität, wie BER, entgegengewirkt werden.

Obwohl Salzstress den marktfähigen Ertrag von Tomatenpflanzen begrenzt, ermöglicht ein etwas höherer Salzgehalt in der Nährlösung die Regulierung der pflanzlichen Wasserverfügbarkeit und die Verbesserung der organoleptischen Fruchtqualität durch Erhöhung von Fruchttrockenmasse, gelösten Stoffen, Fructose, Glucose, titrierbaren Säuren, flüchtigen Verbindungen, Mineralien, Carotin und Vitamin C. Durch Verwendung von NaCl zur Erhöhung des EC (electrical conductivity)-Wertes werden süße Früchte mit intensivem Geschmack und Aroma erzielt (DORAIS et al. 2001).



Nach HAJ-BAKRI (1996) sind die vorwiegend verwendete Maßnahmen zur Minderung des Salzstress auf die Pflanzen folgende:

- die Züchtung von salztoleranten Sorten
- die Entwicklung eines Drainagesystems
- die Optimierung der  $K^+$ - und  $Ca^{++}$ -Versorgung
- die Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften des Bodens durch Zugabe von organischen und synthetischen Substanzen
- die Kultivierung von salztoleranten Arten und Sorten
- die Optimierung der Klimafaktoren im Gewächshaus
- die Anwendung von Wachstumsregulatoren wie Cytokinine und Giberelline deren Wirkung aber noch unklar ist

Die Einführung von salztoleranten Sorten mit Hilfe von traditioneller Züchtung und neueren biotechnologischen Methoden ist aber ein relativ langwieriger Prozess und wenige praktische Erfolge sind bis jetzt erzielt worden (CAYUELA et al. 2001). Selbst bei der Tomate, eine Pflanze mit salztoleranten Verwandten hat sich die Entwicklung von toleranten Sorten als sehr schwierig erwiesen. Außerdem ist diese Methode, sowie auch die Entwicklung eines Drainagesystems, als wichtigste Maßnahmen gegen hohe Salinität, aus ökonomischer Sicht sehr aufwendig und die Anwendung von Wachstumsregulatoren, zumindest bei Gemüse, nur begrenzt zugelassen.

Über diese klassischen Maßnahmen hinaus, zeigen erste Erfahrungen, dass ein Einsatz von nützlichen, die Pflanzenwurzeln besiedelnde Mikroben erfolgreich sein kann bei der Minderung von Salzstress auf die Pflanzen. So demonstrieren ZIMMER et al. (1999) den positiven Einfluss einer Behandlung von Bohnen mit *Bacillus subtilis* auf die Salztoleranz der Pflanzen in Anwesenheit von leichtem Stress (50 mM NaCl). Die Anwendung des Stammes FZB24 führte zu Förderung der Spross- und insbesondere der Wurzelfrischmasse in Abhängigkeit von der Behandlungsart. Eine Samenbehandlung führte zu höherer Biomasseproduktion als eine Wurzelbehandlung der Sämlinge und deshalb wird auf die Wichtigkeit einer frühen Applikation hingewiesen, sodass die Bakterien ausreichend Zeit zur Verfügung haben, die Wurzeln zu kolonisieren. Die Toleranzinduktion scheint mehr von der Aktivität der Zellen des Bakteriums abhängig zu sein, als von der Populationsdichte. Weiterhin zeigten in Ägypten durchgeführte Tests von BOCHOW et al. (2001a) unter ariden Klimabedingungen in salzhaltigem Boden (52 mmol/l) und Bewässerung mit salzhaltigem Grundwasser (83 mmol/l) eine beachtliche salztoleranzerhöhende Wirkung von *B. subtilis* FZB24 bei jeweils zwei Aubergine- und Paprikasorten. Die Wurzelbakterisierung bewirkte bei

Aubergine Ertragserhöhungen bis zu 550 % und bei Paprika bis zu 429 % gegenüber der Salzkontrolle und der schädliche Effekt der Versalzung auf den Ertrag konnte so, um ungefähr die Hälfte bei Aubergine bzw. ein Viertel bei Paprika, reduziert werden. Die bemerkenswerte Wirkung der Pflanzenbakterisierung auf die Salztoleranz konnte auch auf die Fruchtfrischmasse, die prozentuale Fruchttrockenmasse und die Anzahl der Früchte pro Pflanze bei allen Sorten ermittelt werden. Es wurden jedoch primär Pflanzenart- und sekundär Sorten-spezifische Unterschiede beobachtet. Die positive Wirkung einer Applikation von *B. subtilis* auf die pflanzliche Salztoleranz unter NaCl-Versalzung bestätigen auch die Ergebnisse von SALEH et al. (2003). Die vergleichende Untersuchungen zur Verbesserung der Salztoleranz von Artischocken unter Anwendung von *B. subtilis*, Ca<sup>++</sup> und Mikronährstoffen (Fe, Mn und Zn) zeigen, dass die Applikation des Bakteriums die besten Ergebnisse erbrachte im Vergleich zu den restlichen Maßnahmen, unter Erhöhung des Ertrags, des vegetativen Wachstums, der stomatären Leitfähigkeit, der photosynthetischen Rate und der Transpirationsrate der Pflanzen.

Es erscheint von grundsätzlichem Interesse, die Wirkmechanismen einer Salzstresstoleranz erhöhender Wirkung die Pflanzenwurzeln besiedelnder Mikroben, die insbesondere des wachstumsfördernden Rhizobakteriums *B. subtilis*, aufzuklären.

## **2.2 *Bacillus subtilis* als PGPR**

### **2.2.1 Wurzeffekte von *Bacillus subtilis***

Zu den letzten 20 Jahren ist die Verwendung von plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR, Pflanzenwachstum-fördernde Rhizobakterien) zur nachhaltigen Kultivierung von landwirtschaftlich genutzten Flächen in verschiedenen Regionen der Welt exponentiell gestiegen. PGPR haben eine wesentliche Auswirkung auf das pflanzliche Wachstum durch Verbesserung der Nährstoffaufnahme, Pathogenunterdrückung aufgrund der Produktion von Antibiotika und Siderophoren oder antagonistisch wirkender Substanzen und/oder aufgrund der Produktion von biologisch aktiven Substanzen wie Auxine und andere Phytohormone. Das Spektrum der Bakterien, die das pflanzliche Wachstum fördern können ist umfassend und beinhaltet neben *Bacillus* sp. verschiedene *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xanthomonas* und *Serratia* Arten (KHALID et al. 2004). *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn gehört taxonomisch zu der Familie Bacillaceae der Eubacteria. Er ist ein strikt aerobes, mesophiles Bakterium mit Temperaturoptimum zwischen 30°C und 45°C und benötigt keine Wachstumsfaktoren. Seine Zellen sind stäbchenförmig, beweglich und relativ klein (0,7-0,8 x 2-3 µm) mit lateralen Flagellen versehen und bilden runde oder irreguläre

Kolonien. Er produziert Amylasen und Proteasen und bildet ohne Aufschwellen der Zellwände ovale, dünnwandige, resistente Endosporen (0,8 x 1,5-1,8 µm), die zentral in der Zelle liegen (COOK und BAKER 1989). Die Fähigkeit des Bakteriums zur Bildung von widerstandsfähigen Endosporen ist besonders ausgeprägt unter ungünstigen Bedingungen (KNOTT et al. 1995). Nach KREBS et al. (1998) sind nützliche Vertreter von *Bacillus*-Arten in Deutschland besonders Stämme der Spezies *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* (FZB-Stämme). Da jedoch die beiden eng verwandten Formen früher nicht differenziert wurden (SNEATH 1986), sollen beide Spezies als *B. subtilis* geführt werden.

Die antagonistische Wirkung des Rhizobakteriums wurde *in vitro* und *in vivo* hauptsächlich gegenüber bodenbürtigen pilzlichen Pathogenen, wie *Fusarium* spp. (KREBS et al. 1998, SCHMIEDEKNECHT et al. 2001), *Pythium* spp. (GROSCH und JUNGE 1996, KREBS et al. 1998), *Rhizoctonia solani* (SCHMIEDEKNECHT 1993, SCHMIEDEKNECHT et al. 1994, 1995, 1996, KREBS et al. 1998), *Sclerotinia sclerotiorum* (KREBS et al. 1998, SCHMIEDEKNECHT et al. 2001) und Bakterien wie *Streptomyces scabies* (SCHMIEDEKNECHT et al. 1994, 1995, 1996, KREBS et al. 1998), *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter* spp. und *Xanthomonas* spp. (KREBS et al. 1998) beobachtet. Eine erfolgreiche Bekämpfung von *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* und *Erwinia tracheiphila* durch die Behandlung von Gurkenpflanzen im Gewächshaus mit dem *B. subtilis*-Stamm GB03 belegen z. B. die Untersuchungen von RAUPACH und KLOEPPER (1998). Und auch gegen Mischinfektionen der Pflanzen mit *P. syringae* pv. *lachrymans* und *Colletotrichum orbiculare* konnte dieser Stamm erfolgreich angewendet werden. Es wird auch eine gute Kombinierbarkeit des Bakteriums mit anderen PGPR in der Bekämpfung dieser Pathogene sowohl im Gewächshaus, als auch unter Feldbedingungen demonstriert. Die Untersuchungen von KIM et al. (1997) zeigen als weiteres Beispiel eine hohe Effektivität von *Bacillus* sp. L324-92 in der Bekämpfung von *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium irregulare* und *Pythium ultimum* bei Weizenpflanzen.

Mit Hilfe von *B. subtilis* erscheint auch eine Resistenzverbesserung von Pflanzen möglich. Eine gezielte Erhöhung der pflanzlichen Widerstandsfähigkeit aufgrund von exogenen Faktoren ohne Veränderung des Genoms wird als induzierte Resistenz bezeichnet. Die Resistenzinduktion aktiviert schnell ein bereits in Pflanzen vorhandenes, latentes oder wenig ausgeprägtes Potenzial an Abwehrmechanismen ohne negativen Einfluss auf die Ertragsleistung. Sie kann durch Vorinokulation mit Pathogenen, Apathogenen, Endophyten und durch Anwendung abiotischer Induktoren oder Metaboliten pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs - auch von *B. subtilis* -ausgelöst werden (SCHÖNBECK et al. 1993). Obwohl die induzierte Resistenz eine wichtige Rolle bei der Erhaltung von Pflanzen in der Natur einnimmt, blieb sie weit unerkannt bis vor 3 Jahrzehnten. Doch die Erforschung dieses

Phänomens, unter Anwendung von molekularen und biochemischen Methoden brachte Klarheit über seine weite Verbreitung, denn die induzierte Resistenz wurde nachgewiesen in fast allen bis jetzt getesteten Pflanzen und ihre Wirkungsmechanismen überlappen sich teilweise mit Mechanismen, bei denen einzelne Resistenzgene die Grundlage bilden (BOCHOW et al. 2001b). Die Resistenzinduktion bringt einige Vorteile mit sich: Ein breiteres Wirkungsspektrum und höhere Erträge im Vergleich zu der Züchtung resistenter Sorten, die oftmals die Erträge von anfälligen Pflanzen nicht erreichen, Ausschluss von ökotoxikologischen Auswirkungen und kein Selektionsdruck auf Pathogene (SCHÖNBECK und KRASKA 1994). Im Gegenteil zu der biologischen Bekämpfung von Pathogenen, welche nur auf Antibiose oder Konkurrenz basiert, können induziert resistente Pflanzen diese Fähigkeit behalten, auch wenn die Dichte der induzierenden bakteriellen Population schon abgenommen hat. Der Grund dafür kann in der lang anhaltenden Erhöhung der pflanzlichen Abwehrfähigkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen bei Aktivierung der Abwehrmechanismen liegen, oder dass auch kleine Populationsdichten stetig als Signalquellen dienen (KILIAN et al. 2000). Es wird davon ausgegangen, dass die erhöhte Resistenz der Pflanzen auf veränderter Genexpression basiert. In vielen Fällen ist die Resistenzinduktion begleitet von der Induktion verschiedener PR-Proteine (pathogenesis-related proteins), dann wird sie als systemisch erworbene Resistenz (SAR, systemic acquired resistance) bezeichnet. In anderen Fällen steht die Resistenzinduktion aber nicht in Verbindung mit der Akkumulation von PR-Proteinen, dann wird sie als induzierte systemische Resistenz (ISR, induced systemic resistance) bezeichnet (LEEMAN et al. 1996). Die Akkumulation von PR-Proteinen ist eine ubiquitäre pflanzliche Reaktion gegenüber eindringende Pathogene und wird induziert unabhängig von einer spezifischen Wirkung auf das Pathogen (BOCHOW et al. 2001b).

Eine weitere wichtige Aktivität des wurzelkolonisierenden Bakteriums *B. subtilis* ist ein Hervorrufen (Induktion) von Toleranz gegenüber Stresseinflüssen bei den behandelten Pflanzen, verbunden mit Förderung des pflanzlichen Wachstums (BOCHOW et al. 1996). In mehrjährigen Gewächshausversuchen an Kartoffelpflanzen erbrachte die Anwendung verschiedener *B. subtilis*-Stämme Verminderung des Befalls durch *Rhizoctonia solani* und *Streptomyces scabies* bis zu 63 % bzw. 70 % und in Freilandversuchen konnte eine Befallsreduzierung bis zu 50 % bzw. 67 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden. Die bakteriisierten Pflanzen zeigten besseres Wachstum und höhere Vitalität und hatten um durchschnittlich 16 % höhere Erträge (SCHMIEDEKNECHT et al. 1998). Die Behandlung von Tomatenpflanzen in Hydrokultur mit den *B. subtilis*-Stämmen FZB13 und FZB44 bewirkte eine Toleranzinduktion gegenüber *Pythium aphanidermatum* unter deutlicher Verzögerung der Krankheitsentwicklung zu Beginn der Kultur und führte zur Verminderung

der Ertragsverluste (GROSCH et al. 1999).

Toleranz- und/oder Resistenzinduktion bei Pflanzen durch *B. subtilis* konnte oft auch nach Anwendung von Kulturfiltraten des Rhizobakteriums beobachtet werden. So führte die Behandlung von Gerstepflanzen mit B 50, einem proteinreichen Kulturfiltrat aus *B. subtilis*, zu einer Resistenzinduktion gegenüber *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (STEINER et al. 1988, OERKE et al. 1989, KRASKA und SCHÖNBECK 1993, KEHLENBECK et al. 1994, KEHLENBECK und SCHÖNBECK 1995). Die Anwendung desselben Kulturfiltrats bei Weizenpflanzen induzierte eine Toleranzerhöhung sowohl gegenüber dem pilzlichen Erreger *Erysiphe graminis*, als auch gegenüber Aphidenbefall durch *Rhopalosiphum padi* (WITTMANN und SCHÖNBECK 1996). Die Toleranzinduktion war mit Verschiebungen der Attraktionswirkung des „pathologischen“ Sinks zugunsten des natürlichen Sinks verbunden.

Darüber hinaus konnte die wachstumsstimulierende und ertragsfördernde Wirkung von *B. subtilis* auch in Abwesenheit eines Stressfaktors festgestellt werden. GROSCH und GROTE (1998) konnten nach Bakterisierung von Tomatenpflanzen in geschlossener Hydrokultur mit *B. subtilis* FZBA eine erhebliche Ertragssteigerung, sowie eine Verbesserung der Wurzeltrockenmasse der Pflanzen beobachten.

Schließlich verdienen die schon genannten Toleranzerhöhungen gegenüber Salzstress nach einer Pflanzenbehandlung mit *B. subtilis* (ZIMMER et al. 1999, BOCHOW et al. 2001a) noch einmal betont zu werden.

### 2.2.2 Stoffwechselprodukte von *Bacillus subtilis*

Sämtliche Wirkungen von *B. subtilis* wie Antagonismus, Pflanzenwachstumsförderung, sowie Resistenz- und Toleranzinduktion bei den behandelten bzw. besiedelten Pflanzen dürften von freigesetzten Stoffwechselprodukten der Bakterien herrühren, die gegenüber anderen (pathogenen) Organismen und dem Pflanzenstoffwechsel entsprechend aktiv sind. Bisher bekanntes soll dargestellt werden.

Eine Besonderheit von *Bacillus* sp. sind als Stoffwechselprodukte mit breitem Wirkungsspektrum Antibiotika (KIM et al. 1997). Innerhalb der *B. subtilis*-Gruppe, die aus *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* und *B. amyloliquefaciens* besteht, können verschiedene Antibiotika unter aeroben Bedingungen produziert werden, vorwiegend hydrophile Oligopeptide (Bacilysin, Chlorotetain, Rhizotocine) in der logarithmischen Vermehrungsphase und Lipopeptide (Antibiotika der Iturin-Gruppe, Fengymycine) in der stationären Phase, während der Sporulation. Anders als die Lipopeptide, sind die Oligopeptide im Boden nicht stabil. Unter diesen Antibiotika wird Bacilysin wegen der

Regelmäßigkeit des Vorkommens als taxonomisch wichtig für diese Gruppe betrachtet (LOEFFLER et al. 1990). *B. amyloliquefaciens* DSM 10273 produziert auch Iturin-ähnliche Peptide, mit antifungalen, antiviralen, antibakteriellen, Nematoden hemmenden und phytoeffektiven Eigenschaften (KREBS et al. 1996). Eine Wirksamkeit der gereinigten Peptide dieses Typs hinsichtlich der pflanzlichen Wachstumsförderung liegt in dem Bereich <10 µg/ml (KREBS 2003). Die antifungale Aktivität von *B. subtilis* ist hauptsächlich von Nährstoffgehalt, pH-Milieu und Temperatur abhängig (KREBS et al. 1998, SCHMIEDEKNECHT et al. 2001). So zeigte *B. subtilis* die maximale antifungale Aktivität gegenüber *Phytophthora cactorum* zwischen 21°C und 28°C und bei einem pH-Wert zwischen 5,0 und 8,0 (GUPTA und UTKHEDE 1986).

Intensive Studien über den toleranzerhöhenden Wirkungsmechanismus von *B. subtilis* (DOLEJ 1998, BOCHOW und DOLEJ 1999) haben gezeigt, dass dieser nicht nur auf die klassische Induktion durch spezielle bakterielle Proteine basiert, die die pflanzlichen Abwehrmechanismen elizitieren. Anscheinend wird auch das pflanzliche Wachstum stimuliert, durch die Freilassung von exogenen bakteriellen Metaboliten mit Hormoncharakter wie Präkursoren (Indol-3-pyruvat, IPyA) der Auxinsynthese, die in Kulturfiltraten des Bakteriums nachgewiesen wurden, welche von der Pflanze aufgenommen werden und ihre Auxinsynthese antreiben können, als ein Teil des pflanzlichen Regulierungssystems für Wachstumserhöhung und Verbesserung der Gesundheit. Diese Hypothese könnte die relativ unspezifische Aktivität des Bakteriums auf das pflanzliche Wachstum und die Wirkung auf sowohl biotische, als auch abiotische Stressoren erklären (BOCHOW et al. 2001a). Und auch andere Untersuchungen weisen auf eine Implikation von Auxinen in dem Wirkungsmechanismus von *B. subtilis* hin, der Wachstumstimulierung und Toleranzinduktion gegen biotischen und abiotischen Stressfaktoren herbeiführt. Die Ergebnisse von GUPTA et al. (2000) zeigen, dass sowohl das Kulturfiltrat aus der Übergangsphase des *B. subtilis*-Stammes FZB14, als auch eine daraus gewonnene Fraktion, Tr-C, einerseits das Wurzelwachstum von Tomatenpflanzen in Abwesenheit des biotischen Stressfaktors stimulierten und andererseits Resistenz gegenüber *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* induzieren konnten. Darüber hinaus beobachteten sie weitgehende Ähnlichkeit zwischen den Eigenschaften von Tr-C und IPyA und schlussfolgern, dass die Fraktion Tr-C einen Elicitor enthält, der Ähnlichkeit mit IPyA hat und an der Signalauslösung und -transduktion oder an der Aktivierung eines Abwehrgens beteiligt ist. IAA (Indol-3-essigsäure) stimulierte zwar das Wurzelwachstum, konnte aber keine erhebliche Induktion von systemischer Resistenz gegenüber *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* hervorrufen. ALEMAYEHU (1997) demonstrierte mittels klassischer Biotests und Kallusgewebe- und Zellsuspensionskulturen, dass Kulturfiltrate der *B. subtilis*-Stämme

FZB24 und FZB14 und deren Fraktionen zum Teil Auxin- und Cytokininaktivität aufzuweisen scheinen, die im Zusammenhang gesetzt wird mit der Wachstumsförderung von pflanzlichen Zellen bzw. pflanzlichem Gewebe und der Erhöhung der Stresstoleranz gegenüber dem unspezifischen Toxin Fusarinsäure, das von *Fusarium* spp. produziert wird.

MERKYS et al. (1974) demonstrieren eine intensive Auxin-Synthese durch ihren *B. subtilis*-Stamm 7. Am 3. und 4. Kultivierungstag des Bakteriums wurde eine Erhöhung des Gehaltes an freier Indol-3-essigsäure (IAA) im Medium beobachtet, die schließlich 120 µg/100 ml Nährlösung erreichte. Danach nahm die Auxinkonzentration im Medium graduell ab. Da aber der Versuch IAA innerhalb der Zellen von *B. subtilis* sowohl in freier Form, als auch gebunden mit einfachen Proteinen oder Nukleoproteinen zu messen erfolglos blieb, schlussfolgern die Autoren, dass IAA nicht in den Zellen des Bakteriums akkumuliert, sondern direkt im Nährmedium ausgeschieden wird. Und auch IDRIS (2002) konnte IAA in Kulturfiltraten der Stämme FZB24, FZB37, FZB42 und FZB45 nachweisen und so belegen, dass *B. subtilis/amyloliquefaciens* fähig ist Auxin zu produzieren, jedoch nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen der Bakterien, d. h. niedrige Temperatur (22°C), niedrige Durchlüftung (75 rpm) und Dunkelheit. Als detaillierte Befunde (IDRIS et al. 2004) ergab sich für die Kulturfiltrate der *B. amyloliquefaciens*-Stämme FZB24, FZB42 und FZB45 2 nmol/l, 10,8 nmol/l und 1,8 nmol/l IAA und für das Kulturfiltrat des *B. subtilis*-Stammes FZB37 1,3 nmol/l IAA. Neben IAA wurde die Bildung weiterer Wachstumshormone beobachtet. In Kulturfiltraten, die in den oben genannten Bedingungen hergestellt wurden, konnte die Produktion von Indol-3-acetonitril (IAN) und einer Substanz mit Molekulargewicht 173,9 mit Auxin-ähnlichen Bio-Effekten nachgewiesen werden, was bei 37°C und 200 rpm produzierten Kulturfiltraten nicht möglich war. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *B. subtilis/amyloliquefaciens*-Stämme unter bestimmten Wachstumsbedingungen IAA produzieren können über einen biochemischen Weg, in dem IAN auch produziert und/oder verwendet und katalysiert wird durch Nitrilasen, um in Auxin umgewandelt zu werden. Untersuchungen von KHALID et al. (2004) unterstreichen die Effektivität Auxin produzierender PGPR auf die pflanzliche Wachstumsförderung. Sie demonstrieren nach Inokulation von Weizensämlingen mit Bakterien, welche von der Rhizosphäre von Weizenpflanzen isoliert wurden, dass die effektiveren Auxin-Produzenten die beste Wirkung zeigten. Die Auxinbildung *in vitro* korrelierte signifikant mit dem Wachstum der Weizensämlinge unter axenischen Bedingungen, insbesondere mit der Wurzel- und Sprossmasse, was auf eine Verbesserung des Wurzelsystems durch die PGPR gebildeten Auxine mit nachfolgender Erhöhung der Biomasseproduktion schließen lässt. KLOPPER et al. (1991) betrachten die Produktion von Phytohormonen und phytohormonell aktiven Metaboliten als mögliche Ursache für die Förderung des pflanzlichen Wachstums durch

Bakterien, welche die Rhizosphäre von Pflanzen kolonisieren.

Ein weiterer wachstumsfördernder Mechanismus des *B. amyloliquefaciens*-Stammes FZB45 bei Pflanzen, allerdings nur unter P-Mangel, ist die Produktion von Phytase, wie die Untersuchungen von IDRIS (2002) belegen. Phytat ist die wichtigste pflanzliche P-Speicherform, die aber von der Pflanze fast nicht abgebaut werden kann. Unter P-Mangel-Bedingungen und bei Vorhandensein von Phytat kann jedoch die P-Verfügbarkeit der Pflanze durch die Phytase, die von FZB45 produziert wird, erhöht werden.

Untersuchungen über die Fähigkeit von *B. subtilis* FZB24 pflanzliche Wurzeln zu kolonisieren zeigen, dass das Wachstum der Bakterien in der Rhizosphäre, also dem Bereich nahe der Wurzeloberfläche, unmittelbar nach der Kolonisierung der Wurzeln bakterisierter Tomatensamen beginnt und letztlich eine 0,4-0,8 mm dicke Schicht von bakteriellen Zellen um die Wurzeln gebildet wird. Die enge Verbindung von *B. subtilis* mit pflanzlichen Wurzeln wurde auch mittels rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt, die eine direkte Anheftung der Zellen des Bakteriums an die Rhizodermis von Erbsenwurzeln zeigen (KILIAN et al. 2000). Darüber hinaus wurden Unterschiede in der Kolonisierung der verschiedenen Wurzelteile gefunden. Die Wurzelspitzen, welche den physiologisch aktivsten Teil der Wurzel repräsentieren, werden vorwiegend durch *B. subtilis* kolonisiert (ZIMMER et al. 1998). Offensichtlich erfolgt die Bildung der Metaboliten durch *B. subtilis* nur aus einer Interaktion mit der Pflanze und die aktuelle Metaboliten gelangen direkt in den pflanzlichen Zellstoffwechsel.

Die Gewinnung der Stoffwechselprodukte von Bakterien zu Untersuchungszwecken erfolgt meistens aus dem Kulturfiltrat der Bakterien. Bei Instabilität dieser Stoffwechselprodukte, wie im Fall der Auxine, wird die Verwendung technischer Analoga bevorzugt, was wir auch bei unserer Arbeit praktizierten.



### 3 Aufgabenstellung der Arbeit – Untersuchungen

Eine Toleranzerhöhung bei Pflanzen ist nur in Verbindung mit einer Stimulierung des Wachstums denkbar, weshalb wir uns bei den Untersuchungen auf die bisher bekannten Stoffwechselprodukte von *Bacillus subtilis* konzentrierten, die eine Wachstumsförderung bei Pflanzen bewirken:

- Auxin und Auxin-Präkursoren

sowie die, von denen eine Resistenz- oder Toleranzinduktion ausgehen könnte:

- Proteine und Peptide

Da Stressschäden pflanzenspezifisch auftreten, wurde zum Vergleich eine Testpflanze gewählt, die Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), eine Pflanze die in großem Umfang auch in salzhaltigen Böden kultiviert wird.

An Stoffwechselprodukten von *B. subtilis* als Einflussgröße stellten wir zur Testung:

- Kulturfiltrat mit komplexen Stoffgehalt
- Fraktionen von Kulturfiltraten mit Proteinen und Peptiden
- Peptidextrakt mit speziell konzentrierten Peptiden
- Auxin und Auxin-Präkursoren als chemische Stoffe

Mit folgendem Untersuchungsprogramm versuchten wir das mögliche Einflussgeschehen von Stoffwechselprodukten aus *B. subtilis* auf die Salztoleranz der Testpflanze zu erfassen:

1. Axenische Kultur mit Tomatensämlingen in Nährlösung mit dosiertem Salzanteil (150 mM NaCl) und
  - Vorbehandlung der Wurzel durch die Stoffwechselprodukt-Gruppen Kulturfiltrat, Kulturfiltrat-Fraktionen, Peptidextrakt und Auxine
  - Vorbehandlung der Blätter durch die Stoffwechselprodukt-Gruppe Auxine zur Ermittlung des Wachstums und teilweise des Wassergehaltes der Testpflanzen
2. Sprosskultur mit Hypokotylsegmenten von Tomatensämlingen auf Agar mit dosiertem Salzanteil (150 mM NaCl) bzw. ohne Salzanteil und Behandlung durch die Stoffwechselprodukt-Gruppe Auxine zur Ermittlung der Adventivwurzelbildung, sowie der Aufnahme und des Transportes von Auxinen
3. Gewächshauskultur mit Tomatensämlingen in Nährlösung mit dosiertem Salzanteil (100 mM NaCl) und Vorbehandlung der Wurzel durch die Stoffwechselprodukt-Gruppe Auxine zur Ermittlung des Wachstums und des Wassergehaltes

Mit den Testsystemen wurde der Einfluss dosiert applizierter Stoffwechselprodukte aus *B. subtilis* auf die Wachstumsparameter Länge, Frischmasse und Trockenmasse des Sprosses und der Wurzel sowie Blattfläche, den Wassergehalt, die Adventivwurzelbildung (Bewurzelungsrate, Wurzelanzahl und Wurzellänge) und die Aufnahme und den Transport von Auxinen mit Hilfe des Enzymimmuntests (ELISA) ermittelt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

#### Axenische Kultur

Für die Anzucht der Tomatensämlinge wurden Samen der Sorte „Harzglut“ (Saatzucht Quedlinburg GmbH) 15 min mit NaOCl (2 % aktives Cl) sterilisiert und 3-mal mit sterilem Aqua dest. gespült. Danach wurden die Samen mit Hilfe einer Pinzette einzeln in Plastikschaalen ausgesät, welche mit durch Leitungswasser befeuchtetem, sterilem Quarzsand (Körnung 0,6-1,2 mm) gefüllt waren. Anschließend wurden die Schalen in einen Klimaschrank (Heraeus HB 0714) gestellt bei 28 °C und 75 % rel. Luftfeuchte. Der Tag/Nacht Rhythmus betrug 16/8 h und die Belichtungsintensität 15 kLux. Die Aussaat wurde mit sterilem Leitungswasser gegossen. Nach 8 Tagen waren die Sämlinge versuchsbereit.

Die Zusammensetzung der Nährlösung erfolgte nach GÖHLER und DREWS (1986, zitiert in DOLEJ 1998) und wurde speziell für Tomatensämlinge modifiziert. Die Nährlösung wurde unter weitgehend axenischen Bedingungen hergestellt. Folgende Zusammensetzung wurde verwendet:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,88 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,126 g
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0,39 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,31 g
$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_8\text{N}_2\text{Fe}$	3,1 mg
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1,01 µg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,56 µg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,098 µg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,124 µg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,322 µg

Aqua dest. ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit 1N KOH auf 5,8 eingestellt.

Für die Tests mit Wurzelapplikation wurden die Tomatensämlinge nach 8-tägiger Anzucht mit sterilem Aqua dest. aus dem Quarzsand ausgeschwemmt und vorsichtig von anhaftenden Sandkörnern befreit, um die Unversehrtheit der Wurzeln zu gewährleisten. Es wurden Sämlinge ausgewählt, die einen möglichst gleichen Phänotypus hatten.

Die Sämlinge wurden in Reagenzgläser (16 cm x Ø 1,8 cm) kultiviert, die mit jeweils 22 ml der Nährlösung gefüllt waren. Die Menge der Nährlösung in den Reagenzgläsern war so kalkuliert, dass die Wurzeln völlig in die Nährlösung eintauchten. Der Nährlösung

hinzugefügt war die entsprechende Testsubstanz. Nach dem Befüllen der Reagenzgläser wurden sie mit Nescofilm verschlossen und anschließend mit Hilfe einer heißen Impföse mit einem ca. 4 mm großen Loch in der Mitte versehen. Durch diese Öffnung wurden dann die Pflanzen in die Reagenzgläser eingeführt. Der Flüssigkeitsentzug der Testpflanzen wurde nach Bedarf mit einer definierten Menge sterilem Aqua dest. bzw. Nährlösung mittels einer 5 ml Einmalspritze ausgeglichen. Jede Behandlungsvariante beinhaltete 10 Pflanzen.

Im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Zusatz von Prüfsubstanzen (Kontrolle -) wurden die Sämlinge für 8 Tage im Klimaschrank kultiviert. Es wurde ein Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 h, eine Temperatur von 24 °C am Tag und 19 °C in der Nacht und eine rel. Luftfeuchte von 75 % gehalten. Die Belichtungsintensität betrug 15 kLux.

Nach der 8-tägigen Kultivierung der Sämlinge wurde die Nährlösung mit einer 25 ml Pipette, welche an der Spitze mit einem feinen, sterilen Schlauch verlängert war, mittels einer elektronischen Pipettierhilfe (Pipetboy, Integra Biosciences) abgesaugt. Der Schlauch wurde hierzu 2-mal durch die Öffnung im Nescofilm-Verschluss bis zum Boden vom Reagenzglas eingeführt. Danach wurden auf dieselbe Weise 22 ml einer salzhaltigen Nährlösung der gleichen Zusammensetzung, jedoch ohne Prüfsubstanz, eingefüllt. Die NaCl-Konzentration der Nährlösung betrug 150 mM.

Im Vergleich zu einer Kontrollvariante ohne Zusatz von Prüfsubstanzen und Salz (Kontrolle -) und zu einer Kontrollvariante ohne Zusatz von Prüfsubstanzen aber mit Salz (Kontrolle +) wurden die Testpflanzen für 7 Tage unter den gleichen Bedingungen weiterkultiviert und nach insgesamt 15-tägigem Wachstum geerntet.

Auf dem gleichen Schema basieren die Tests mit Blattapplikation. Der einzige Unterschied zu der Wurzelapplikation ist, dass die Testsubstanzen nicht der axenischen Nährlösung beigelegt waren, sondern in Leitungswasser gelöst 2-mal auf die Blattoberfläche bis zur vollständigen Benetzung gesprüht wurden, und zwar am 1. und 3. Tag nach der Übertragung in die Reagenzgläser. Jede Behandlungsvariante beinhaltete ebenfalls 10 Pflanzen.

### **Sprosskultur**

Die Tests der Sprosskultur, sowie die hormonanalytischen Untersuchungen wurden im Institut für Biologie, AG Angewandte Botanik, der HUB durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt Dr. Ross für die Anweisung und die intensive Unterstützung!

Zur Desinfektion wurden Samen der Sorte „Moneymaker“ für 5 min in 0,2 %  $\text{HgCl}_2$  (Test zur Ermittlung der Adventivwurzelbildung) oder 2 %  $\text{NaOCl}$  (Test zur Ermittlung der Aufnahme und des Transportes von Auxinen) geschüttelt und nachfolgend 3-mal in sterilem Aqua dest. gespült. Dann wurden die Samen mittels einer Pinzette in Schraubdeckelgläsern (9 cm, Ø 8

cm), welche steriles, hormonfreies Medium beinhalteten, einzeln ausgesät. Schließlich wurden die Gläser in einen klimatisierten Raum gestellt bei  $23 \pm 2$  °C unter kontinuierlichem Weißlicht. Nach etwa 24 Tagen waren die Tomatensämlinge für die Sprosskultur einsatzbereit.

Das verwendete Nährmedium basiert auf dem MS-Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962). Es wurde die folgende Zusammensetzung verwendet:

KNO <sub>3</sub>	1,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,37 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,44 g
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6 mg
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg
KI	0,83 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8 mg
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3 mg
Myo-Inositol	0,1 g
Thiamin-HCl	0,4 mg
Saccharose	20 g
Gelrite	3,6 g

Aqua dest. ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit 40 %-KOH auf 5,8 eingestellt.

Die Sprosskultur wurde auf sterilem Medium durchgeführt, das in Kulturgefäße (4,5 cm x Ø 10 cm) gegossen wurde. Es wurden ca. 2 cm lange Hypokotylsegmente von durchschnittlich 24 Tage alten Pflanzen verwendet, die im Medium kultiviert wurden unter Zusatz der Prüfsubstanzen bzw. ohne Zusatz von Prüfsubstanzen in der Kontrolle. Alle Varianten wurden mit und ohne NaCl unter den gleichen Bedingungen weiterkultiviert. Jede Variante beinhaltete 25 Segmente im Test zur Ermittlung der Adventivwurzelbildung bzw. 45 Segmente im Test zur Ermittlung der Aufnahme und des Transportes von Auxinen.

## Gewächshauskultur

Die Gewächshausversuche wurden im Fachgebiet Gemüsebau der LGF der HUB durchgeführt. Mein Dank gilt den Mitarbeitern des Fachgebiets für die freundliche Unterstützung!

Für die Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus wurden Samen der Sorte „Harzfeuer“ (Julius Wagner GmbH) entsprechend der axenischen Kultur, jedoch ohne Desinfektion angezogen.

Die verwendete Nährlösung wurde nach PENNINGSFELD und KURZMANN (1966) zusammengesetzt (modifiziert). Es wurde die folgende Zusammensetzung verwendet:

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,511 g
KNO <sub>3</sub>	0,332 g
Kalimagnesia (30% K, 10% Mg)	0,336 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,168 g
Fetrilon (13% Fe-Chelat)	5,2 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	5 mg
MnSO <sub>4</sub>	2,5 mg
CuSO <sub>4</sub>	0,25 mg
ZnSO <sub>4</sub>	0,25 mg
NH <sub>4</sub> -Molybdat	0,05 mg

Aqua dest. ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 5,5-6,3 eingestellt.

Die 8 Tage alten Tomatensämlinge wurden vorsichtig mit Leitungswasser aus dem Quarzsand ausgeschwemmt. Phänotypisch ähnliche Pflanzen wurden danach in Laborgläsern (8,5 cm x Ø 9,5 cm) überführt, welche mit Quarzsand (Körnung 0,6-1,2 mm) gefüllt waren. Der Quarzsand war mit einer Lösung der entsprechenden Testsubstanz bis zur Sättigung durchnässt. Die Konzentrationseinstellung der Hormonlösungen erfolgte ebenfalls mit Leitungswasser. Das Gießverfahren wurde noch 2-mal wiederholt, im Abstand von jeweils 2 Tagen. Nach 6 Tagen waren die Sämlinge bereit für die Aufstellung im Gewächshaus.

Die Versuche wurden in Plastiktöpfen (13 cm x Ø 21 cm) durchgeführt, die mit 3,5 l Nährlösung gefüllt waren. Jeder Topf war mit einem Deckel mit jeweils 4 Öffnungen versehen, durch welche die 14 Tage alten hormonbehandelten Sämlinge in die Nährlösung eingehängt wurden. Um eine geeignete Position der Pflanzen zu gewährleisten wurden sie mit Schaumstoffstückchen befestigt. Der Deckel war in der Mitte mit einer zusätzlichen

Öffnung versehen, durch die ein Kapillarschlauch die Nährlösung mit Luft anreicherte, um die Algenbildung zu verhindern und das Wurzelwachstum zu stärken. Bei Bedarf wurde mit einer definierten Menge Nährlösung gegossen. Jede Behandlungsvariante beinhaltete 10 Pflanzen.

Die Versuchspflanzen wurden bei einer Temperatur von  $\varnothing$  22 °C und einer rel. Luftfeuchte von  $\varnothing$  37 % kultiviert. Die Mindestwerte für Temperatur und rel. Luftfeuchte betrugen 17,5 °C und 23 % und die entsprechenden Höchstwerte 30,5 °C und 70 %. Aufgrund technischer Probleme war eine Klimaregelung nur begrenzt möglich.

Die Salzapplikation erfolgte stufenweise, um ein Absterben der Pflanzen zu verhindern. 4 Tage nach dem Überführen der Tomatensämlinge im Gewächshaus wurde die Nährlösung ersetzt mit einer Nährlösung derselben Zusammensetzung, aber mit Zusatz von NaCl in der physiologischen Konzentration von 50 mM. Nach 3 Tagen wurde der Vorgang wiederholt und die Nährlösung erneut ausgetauscht. Die neue Nährlösung hatte eine Salzkonzentration von 100 mM.

Im Vergleich zu einer Kontrollvariante ohne Zusatz von Prüfsubstanzen und Salz (Kontrolle -) und zu einer Kontrollvariante ohne Zusatz von Prüfsubstanzen aber mit Salz (Kontrolle +) wurden die Testpflanzen für 20 Tage unter den gleichen Bedingungen (bezogen auf obige Durchschnittswerte) weiterkultiviert und nach insgesamt 33-tägigem Wachstum geerntet.

#### **4.2 Stoffwechselprodukte von *Bacillus subtilis***

Die standardisierte Herstellung der Kulturfiltrate (KF), sowie ihre Fraktionierung und die Gewinnung des Peptidextraktes erfolgten durch die FZB Biotechnik GmbH Berlin, Hersteller des Pflanzenstärkungsmittels FZB24<sup>®</sup>, bei deren Mitarbeiter ich mich herzlich bedanke für die Hilfestellung.

Es wurden Stoffwechselprodukte der Stämme FZB24 und FZB41 verwendet. Das Lysotypieverhalten von FZB24 durch verschiedene Bakteriophagen ergab eine Zuordnung zu der Art *Bacillus amyloliquefaciens* (KREBS et al. 1998). Die Stammidentifizierung von FZB24 durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bestätigte dieses Ergebnis (DSM ID 96-2). Die Stammidentifizierung von FZB41 durch die DSMZ ergab ebenfalls eine Zuordnung zu der Art *B. amyloliquefaciens* (DSM ID 96-1). Dennoch werden die beiden Stämme FZB24 und FZB41 nachfolgend als *B. subtilis* aufgeführt.

### **Herstellung der Kulturfiltrate**

Für die Kultivierung der Bakterien wurde das synthetische Medium nach LANDY et al. (1948) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,15 mg
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	5 mg
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,16 mg
Glucose	20 g
L-Glutaminsäure	5 g

Aqua dest. ad 1 l

Der pH-Wert wurde nach dem Sterilisieren mit 3 N NaOH auf 7,0 eingestellt.

Die KF von FZB24 wurden aus der Übergangsphase des Fermentationsprozesses gewonnen. Die Kulturdauer betrug ca. 12 h. Die Kulturbedingungen waren: Temperatur 27°C, Schüttelfrequenz 220 rpm, Kulturgefäße 500 ml-Rundschüttelkolben mit je 150 ml Landy-Medium. Zum Zeitpunkt der Ernte hatte die Population eine Bakteriendichte von ca.  $5 \times 10^8$  cfu/ml erreicht. Mittels Zentrifugation bei 9000 U/min für eine Dauer von 15 min. wurde der Überstand absepariert und anschließend durch Filtration mit einer Porengröße von 0,2 µm das Sterilfiltrat hergestellt.

Das Kulturfiltrat aus der Übergangsphase des Stammes FZB24 wurde in einem axenischen Test durch Wurzelbehandlung der Pflanzen in 1 %- und 0,1 %-Konzentration geprüft.

### **Fraktionierung der Kulturfiltrate**

Die Peptidfraktionierung wurde an KF von *B. subtilis* FZB24 durchgeführt, die einerseits die Übergangsphase (Fermentationsphase) repräsentieren und andererseits nach der 19. h gewonnen wurden. Sie wurden nach Zentrifugation und Sterilfiltration lyophilisiert. Zur Anreicherung wirksamer Komponenten wurden die lyophilisierten KF in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 6,5, gelöst. Danach wurden sie mit dem Adsorberharz XAD-7 (Serva) behandelt, sowohl im batch als auch in der Säule das KF-Übergangsphase bzw. in der Säule das KF-19. h. Das Harz wurde dann mit Phosphatpuffer gewaschen und stufenweise mit 20%-, 50%-, 10%- und 20%-Acetonitril im KF-Übergangsphase bzw. mit 5%-, 10%-, 20%-, 30%- und 50%-Acetonitril im KF-19. h eluiert.



Die Eluate wurden schließlich im Vakuum eingeeengt und deren Peptidgehalt durch HPLC

(high performance liquid chromatography) bestimmt. Die LiChrospher-Säulen 100 RP-18 (5 µm) hatten die Abmessung 125 x 4 mm (Merck). Die Detektionswellenlänge betrug 220 nm. Zur Elution wurde ein Gradient mittels der folgenden Lösungen verwendet:

- 0,007 M Phosphatpuffer, pH 3 / Acetonitril (20 Vol.-%)
- 0,007 M Phosphatpuffer, pH 3 / Acetonitril (80 Vol.-%)

Die Zuordnung der durch Elution entstandenen KF-Fractionen zu den verschiedenen Acetonitrilkonzentrationen ist in der Tabelle 1 dargestellt. Die Abbildung 1 verdeutlicht die Fraktionierung des KF aus der Übergangsphase.

### KF - Übergangsphase

1) 20%-Acetonitril   2) 50%-Acetonitril

**Fraktion batch-20**      **Fraktion batch-50**

3) 10%-Acetonitril   4) 20%-Acetonitril

**Fraktion 8-13**   **Fraktion 14-16**

Abb. 1: Peptidfraktionierung des Kulturfiltrats aus der Übergangsphase von FZB24

Tab. 1: Peptidfraktionierung der Kulturfiltrate aus der fermentativen Übergangsphase und der 19. h von FZB24 und Peptidgehalte der beiden Kulturfiltrate und der daraus entstandenen Fraktionen

KF/ KF-Fraktion	Elution durch Acetonitril	Volumen (ml)	Peptide (mg/ml)	Peptide (mg/ Fr.)	Ausgang für
<b>KF-Übergangsphase</b>	-	1100	<b>0,0242</b>	26,6	batch-Trennung
<b>Fraktion batch-20</b>	20 %	9	<b>0,62</b>	5,6	Säulen-Trennung
<b>Fraktion batch-50</b>	50 %	3,96	<b>2,51</b>	9,94	-
<b>Fraktion 8-13</b>	10 %	2	<b>0,33</b>	0,66	-
<b>Fraktion 14-16</b>	20 %	2,7	<b>1,34</b>	3,62	-
<b>KF-19. h</b>	-	300	<b>0,0498</b>	14,94	Säulen-Trennung
<b>Fraktion 12-18</b>	5 %	2	<b>0,028</b>	0,056	-
<b>Fraktion 19-25</b>	10 %	2,1	<b>0,011</b>	0,023	-
<b>Fraktion 26-31</b>	20 %	2,2	<b>0,51</b>	1,12	-
<b>Fraktion 32-36</b>	30 %	2,3	<b>4,72</b>	10,86	-
<b>Fraktion 37-41</b>	50 %	2,8	<b>1,07</b>	3	-



Die KF-Fractionen batch-50, 8-13 und 14-16 aus dem KF der Übergangsphase und die KF-Fractionen 12-18, 19-25, 26-31, 32-36 und 37-41 aus dem KF der 19. h wurden in axenischen Tests durch Wurzelbehandlung der Pflanzen in 20 %-, 2 %- und 0,2 %-Konzentration geprüft.

### **Herstellung des Peptidextraktes**

Der hochangereicherte, antifungale Peptidextrakt (PE) von FZB41 hatte einen Gehalt an zyklischen Lipopeptiden von 47 %. Die von diesem Stamm gebildeten Lipopeptide entsprechen jenen, die von *B. subtilis* FZB24 synthetisiert werden, wie durch HPLC-Analyse nachgewiesen werden konnte (OCKHARDT 2003). Die Anreicherung der Peptide erfolgte durch methanolische Extraktion der sauren Peptidfällung (KREBS et al. 1996).

Der PE wurde in einem axenischen Test durch Wurzelbehandlung der Pflanzen in den Konzentrationen 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml und 0,001 µg/ml geprüft.

### **Auxine**

Es wurde die Wirksamkeit folgender Auxine getestet:

- TRP, D-Tryptophan (Sigma No. T-9753)
- IPyA, Indol-3-pyruvat (Sigma No. I-7017)
- IAAld, Indol-3-acetaldehyd (Sigma No. I-1000)
- TAM, Tryptamin (Sigma No. T-2891)
- IAM, Indol-3-acetamid (Sigma No. 286281)
- IAA, Indol-3-essigsäure (Sigma No. I-2886)

In den axenischen Tests wurden die Auxine sowohl durch Wurzelbehandlung (alle), als auch durch Blattbehandlung (TRP, IPyA, IAAld, IAA) der Pflanzen in den physiologischen Konzentrationen von  $10^{-5}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-10}$  M geprüft. Im Test zur Ermittlung des Wassergehaltes wurden TRP, IPyA, IAAld und IAA lediglich in den Konzentrationen von  $10^{-5}$  M und  $10^{-10}$  M geprüft. Die angewandten Konzentrationen wurden hier und im Gewächshausversuch mittels einer Verdünnungsreihe hergestellt, die unmittelbar vor dem Einsetzen der Versuchspflanzen erfolgte.

Im Test der Sprosskultur zur Ermittlung der Adventivwurzelbildung wurden TRP, IPyA, IAAld und IAA in den Konzentrationen von  $10^{-5}$  M und  $10^{-7}$  M mit und ohne NaCl geprüft. Im Test der Sprosskultur zur Ermittlung der Aufnahme und des Transportes von Auxinen wurden IPyA und IAA in der Konzentration von  $10^{-5}$  M ebenfalls mit und ohne NaCl geprüft.

Im Gewächshausversuch wurden TRP, IPyA, IAAld und IAA in den Konzentrationen von  $10^{-5}$  M und  $10^{-10}$  M geprüft.

### 4.3 Bestimmung der Prüfparameter

#### Erfassung der Wachstumsparameter

In den axenischen Tests wurde die Wirksamkeit der Behandlungen mit den Testsubstanzen anhand der Parameter Sprosslänge, -frischmasse, -trockenmasse, Blattfläche, Wurzellänge, -frischmasse und -trockenmasse ermittelt. Im Gewächshausversuch wurden dieselben Parameter ermittelt mit Ausnahme die Wurzellänge.

Die Trockenmasse wurde nach 48 h Trocknung bei 60 °C in den axenischen Tests und bei 60-65 °C im Gewächshausversuch bestimmt.

Die Blattfläche wurde mit einem optischen Gerät (Li Cor 3100 Area Meter) gemessen.

Die Wurzellänge wurde als absolute Wurzellänge nach NEWMAN (1966) kalkuliert. Dazu wurde das Wurzelsystem einer Pflanze auf einem 1x1 cm Raster gelegt innerhalb einer mit Wasser gefüllten Schale und die Anzahl der Schnittpunkte der Wurzeln mit den horizontalen und vertikalen Gitternetzlinien gezählt. Die Wurzellänge wurde dann nach folgender Formel errechnet:

$$R = \frac{\pi \cdot N \cdot A}{2 \cdot H}$$

*R = absolute Wurzellänge*  
*N = Anzahl der Schnittpunkte*  
*A = Fläche des verwendeten Rasters*  
*H = totale Länge aller Gitternetzlinien*

#### Bestimmung des Wassergehaltes

Im axenischen Test wurden die Tomatensämlinge in Apex, Blätter, Kotyledonen, Stängel und Wurzel getrennt. Unmittelbar danach wurde die Frischmasse bestimmt und das Material bei -80 °C gelagert. Dann wurde das Material einer Lyophilisation bis zur Gewichtskonstanz unterzogen und anschließend die Trockenmasse bestimmt.

Im Gewächshaustest wurde die Frischmasse unmittelbar nach der Ernte und die Trockenmasse von Spross und Wurzel nach 48 h Trocknung bei 60-65 °C bestimmt.

Der Wassergehalt wurde nach KERKEB et al. (2001) mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Wassergehalt} = \frac{\text{Trockenmasse}}{\text{Frischmasse}} \times 100$$

### **Erfassung der Adventivwurzelbildung**

In der Sprosskultur wurde die Adventivwurzelbildung der Hypokotylsegmente anhand der Parameter Bewurzelungsrate, Wurzelanzahl und Wurzellänge charakterisiert, die nach PINKER (1984) errechnet wurden:

$$\%W = \frac{\text{Anzahl} \cdot \text{der} \cdot \text{bewurzelten} \cdot \text{Segmente}}{\text{Anzahl} \cdot \text{der} \cdot \text{eingesetzten} \cdot \text{Segmente}} \times 100 \quad \%W = \text{Bewurzelungsrate}$$

$$W/S = \frac{\text{Anzahl} \cdot \text{der} \cdot \text{gebildeten} \cdot \text{Wurzeln}}{\text{Anzahl} \cdot \text{der} \cdot \text{eingesetzten} \cdot \text{Segmente}} \quad W/S = \text{Wurzelanzahl}$$

$$W_L = \frac{\text{Summe} \cdot \text{der} \cdot \text{Wurzellängen}}{\text{Anzahl} \cdot \text{der} \cdot \text{gebildeten} \cdot \text{Wurzeln}} \quad W_L = \text{Wurzellänge}$$

### **Ermittlung der Aufnahme und des Transportes von Auxinen**

Nach 2, 4 und 6 Tagen wurden jeweils 15 Hypokotylsegmente den Kulturgefäßen der Sprosskultur entnommen und von basal anhaftenden Mediumresten befreit. Unmittelbar danach wurde die Frischmasse bestimmt und das Material bei -80 °C gelagert. Nach Vollendung der Probenentnahme wurden die Segmente einer Lyophilisation unterzogen, die bis zur Gewichtskonstanz durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Trockenmasse bestimmt und das Material bis zur weiteren Aufarbeitung bei - 80 °C gelagert.

Zur Extraktion wurden die gefriergetrockneten Segmente mit einem Glasstab pulverisiert und mit 80 % (v/v) Methanol versetzt. Dem Methanol wurden pro Liter 100 mg Butylhydroxytoluol (Sigma Nr. B 1378) als Antioxidationsmittel zugesetzt. Es wurden 10 ml des Extraktionsmittels pro Gramm Frischmasse verwendet. Die Extraktion erfolgte über Nacht (mind. 12 h) bei 4 °C unter Lichtabschluss.

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Der Extrakt wurde vorgereinigt mittels einer Filtration durch einen Glasfaser-Vorfilter (Schleicher und Schüll, Nr. 6) mit Hilfe einer Vakuumpumpe. Danach wurde der Methanolanteil der Proben durch Zugabe von deionisiertem H<sub>2</sub>O auf 70 % gesenkt und eine Festphasenextraktion mittels PR18-Kartuschen (Amchro, Merck) mit Hilfe einer Vakuumpumpe durchgeführt. Anschließend wurden die methanolischen Extrakte in einer Vakuumzentrifuge (Univapo 100 H/Unijet II) eingengt. Die Endvolumina betrugen jeweils 500 µl.

Die HPLC-Reinigung wurde mit einer computergesteuerten Anlage der Firma Beckman durchgeführt. Sie bestand aus einem Pumpenmodul 125NM, einem UV-Detektor 166NM und der Software System Gold Version 8.10. Außerdem wurde eine Säulenheizung (W.O. electronic BFO-04) und ein Fraktionssammler (Pharmacia LKB Frac100) eingesetzt.

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden durch einen 0,2 µm-Filter filtriert und unter Vakuum im Ultraschall entgast. Die HPLC-Trennung erfolgte mittels einer LiChrospher-Säule 100 RP 18, 10 µm, (Merck) bei einer Säulentemperatur von 45 °C durch eine Gradientenelution. Laufmittel waren Methanol, HPLC-grade (Roth) und TEAA (Triethylaminessigsäure)-Puffer, 40 mM, pH 3,5. Die Probeninjektion erfolgte mittels eines Injektors mit automatischem Signalgeber in eine 100 µl-Schleife. Das verwendete Elutionsprogramm ist folgendes:

Säule: Lichrosphere RP 18, 10 µm, 250-4 mm, mit Vorsäule (Merck)

Temperatur: 45 °C

Laufmittel: Methanol / TEAA-Puffer 40 mM, pH 3,5

Zeit	Methanol (%)	TEAA-Puffer (%)	Fluss (ml/min)
0	35	65	1,0
10	40	60	1,0
12	95	5	1,2
13	98	2	1,2
18	98	2	1,2
22	98	2	1,0
25	35	65	1,0

Die Detektion erfolgte bei 254 nm. Die Retentionszeit von IAA wurde durch Injektion von 2 µg IAA in 100 µl Methanol ermittelt.

Zur IAA-Bestimmung wurden lediglich die der Retentionszeit entsprechenden Fraktionen berücksichtigt und unter Stickstoff getrocknet. Die IAA-Fractionen wurden anschließend mittels einer ätherischen Diazomethanol-Lösung methyliert (SCHLENK und GELLERMANN 1960). Alle Proben wurden bis zum quantitativen Nachweis bei -80 °C gelagert.

Der Enzymimmuntest (ELISA) ist eine Methode zum quantitativen Nachweis von Antigenen. Eine definierte Menge von enzymmarkiertem Antigen konkurriert mit einer unbekannten Menge an freiem Antigen in der zu messenden Probe um einen spezifischen Antikörper, der an einer festen Phase adsorbiert ist. Durch eine Waschprozedur werden alle nicht gebundenen enzymgekoppelten und freien Antigene entfernt. Nach der Zugabe eines Enzymsubstrates wird die Enzymaktivität des gebundenen enzymmarkierten Antigens gemessen. Das ist ein Maß für den Antigengehalt der Probe.

Alle notwendige Lösungen für den immunologischen Nachweis wurden bei 4 °C aufbewahrt.

Es wurden folgende Materialien benötigt:

- Monoklonale Antikörper: Anti-IAA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Institut für Biologie, HUB)
- Antigene (IAA-ME, Fluka No. 57350), methanolische Stammlösung in einer Konzentration von 1  $\mu$ M / 100  $\mu$ l
- RAMIG (Anti Mouse IgG; Sigma No. M-9637) 1:1000 Verdünnung
- enzymmarkiertes Antigen, Eigensynthese des Instituts für Biologie der HUB nach MERTENS et al. (1985)
- TBS-Puffer, pH 7,8 (6,05 g Tris, 0,58 g NaCl, 0,203 g  $\text{MgCl}_2$ )
- TBS/Gelatine-Puffer (1 g Gelatine / 1 l TBS-Puffer; 30 min bei 121 °C autoklaviert)
- $\text{NaHCO}_3$ -Puffer 50 mM, pH 9,6
- Paranitrophenylphosphat (Sigma)
- Mikrotitrationsplatten (Greiner)
- Mikrotitrationsplatten-Photometer (405 nm)

Die Mikrotitrationsplatten wurden mit RAMIG-Lösung beschichtet (200  $\mu$ l/Cup) und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten dekantiert, gewaschen und mit den monoklonalen Antikörpern über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten dekantiert und 2-mal mit Leitungswasser gewaschen.

Der eigentliche Immuntest wurde wie folgt durchgeführt: Die Platten wurden mit einer IAA-Standardverdünnungsreihe, sowie mit den zu messenden Proben beschickt (in je 100  $\mu$ l TBS-Puffer) und 1 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Antigen-Enzym-Komplex (Tracer) in einer Verdünnung 1:500 dazugegeben und der Ansatz bei 4 °C 3 h inkubiert. Der Ansatz wurde dekantiert und die Platten 2-mal mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden je Kavität 200  $\mu$ l Paranitrophenylphosphat (1 mg/ml in  $\text{NaHCO}_3$ -Puffer) aufgetragen und der Ansatz bei 37 °C 1 h inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei  $\lambda=405$  nm. Anhand der Eichkurve wurde der Antigengehalt der Proben errechnet. Alle Proben wurden 4-mal gemessen.

#### **4.4 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows 9.0. Bei Vorliegen von Varianzhomogenität wurden die Messwerte durch einfaktorielle

Varianzanalyse (ANOVA) unter Anwendung des Tukey-Tests verrechnet. Bei nicht vorhandener Varianzhomogenität wurde der Kruskal-Wallis-Test, ein nicht parametrisches Verfahren für k unabhängige Stichproben, oder der Chi-Quadrat-Test, ein ebenfalls nicht parametrisches Verfahren für eine Stichprobe herangezogen. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit 1. Art mit  $p \leq 0,05$  zugelassen.

Die Auswertung der Daten für die Wurzelfrischmasse und die Wurzeltrockenmasse des Gewächshausversuchs erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS unter Anwendung des Tukey-Tests. Es wurde auch hier eine Irrtumswahrscheinlichkeit 1. Art mit  $p \leq 0,05$  zugelassen.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit verschiedenen Buchstaben (Tukey-Test und Kruskal-Wallis-Test) oder mit \* (Chi-Quadrat-Test) gekennzeichnet. In allen Tabellen ist die Standardabweichung angegeben, sowie die Grenzdifferenz des Tukey-Tests für den einschlägigen Parameter.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Axenische Kultur mit Kulturfiltrat von FZB24

Der Einfluss der hohen Salzbelastung und die Wirkung des KF (Kulturfiltrat) aus der fermentativen Übergangsphase auf das Wachstum der Testpflanzen ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Die Introduktion des Stressfaktors wirkte sich unterschiedlich auf die Parameter des Sprosswachstums aus. Bei der Länge führte die Salzapplikation zu einer signifikanten Reduzierung, bei der Frischmasse dagegen zu einer erheblichen Erhöhung gegenüber der gesunden Kontrolle. Die Trockenmasse und die Blattfläche wurden tendenziell durch die NaCl-Applikation ähnlich beeinflusst wie die Länge, diese Einflüsse waren jedoch statistisch nicht bedeutsam.

Die Behandlung der Tomatensämlinge mit dem KF, sowohl der 1 %- Konzentration, als auch der 0,1 %-Konzentration, hatte keine statistisch gesicherte Wirkung auf das Sprosswachstum. Erwähnenswert ist jedoch, dass die 1 %-Konzentration eine leichte, besonders bei der Trockenmasse erkennbare Wachstumsdepression herbeiführte, die 0,1 %-Konzentration dagegen eine leichte Stimulierung, die insbesondere bei der Länge ersichtlich ist. Dabei stellt die Sprosslänge eine Ausnahme dar, da sie durch beide KF-Konzentrationen leicht gefördert wurde im Vergleich zu der gestressten Kontrolle.

Alle Wachstumsparameter der Wurzel wurden durch die Einführung des Stressors signifikant gehemmt gegenüber der gesunden Kontrolle.

Die Anwendung des KF zeigte keinen erheblichen Einfluss auf das Wurzelwachstum. Ähnlich wie beim Spross, bewirkte aber auch bei der Wurzel die 1 %-Konzentration des KF eine leichte Hemmung und die 0,1 %-Konzentration eine leichte Stimulierung des Wachstums. Lediglich bei der Trockenmasse mit den sehr geringen absoluten Werten war dieser Effekt nicht ersichtlich.

Bei den meisten Wachstumsparametern, einschließlich Blattfläche (Abbildung 2), wurde durch das KF 0,1 % - nicht 1 % - ein etwas besseres Wachstum der Testpflanzen bei Salzstress erzielt, d. h. eine, wenn auch nicht signifikante, so doch erkennbare Toleranzerhöhung wurde hervorgerufen. Dies war bei 1 %-KF nicht der Fall, weshalb es offenbar spezielle Stoffe im KF gibt, die bei bestimmten Konzentrationen wirkten. Da dieser positive Effekt des KF zum einen bei geringerer Konzentration (0,1 %) mehr als bei höherer Konzentration (1 %), und zum anderen nach nur 7 Tagen Einwirkung ersichtlich war, kann er nicht auf eine Nährstoffwirkung zurückgeführt werden. Vielmehr ist anzunehmen, dass dieser Einfluss auf bestimmten Stoffen beruht, die in das pflanzliche Toleranzgeschehen eingreifen.

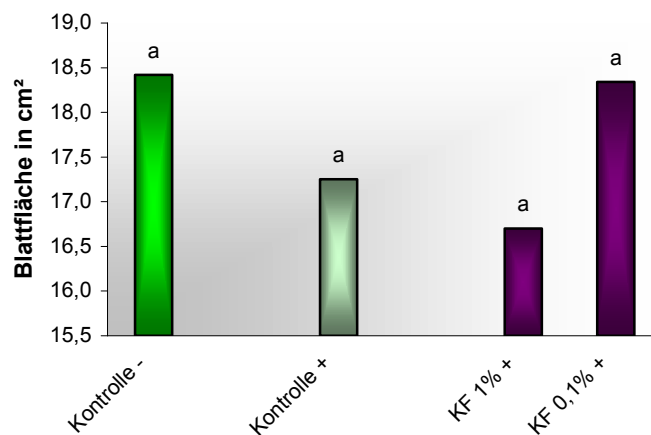


Abb. 2: Wirkung einer Wurzelapplikation des Kulturfiltrats-Übergangsphase von FZB24 auf die Blattfläche von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Tab. 2: Wirkung einer Wurzelapplikation des Kulturfiltrats-Übergangsphase von FZB24 auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10,  $n_{WL}=5$ , Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ , \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit  $p \leq 0,05$ ,  $HSD_{SL}=0,55$ ,  $HSD_{SFM}=0,14$ ,  $HSD_{STM}=11,48$ ,  $HSD_{BF}=2,75$ ,  $HSD_{WL}=29,15$ ,  $HSD_{WFM}=38,81$ )

		Kontrolle -	Kontrolle +	KF 1% +	KF 0,1% +
SL	cm	7,0 ± 0,4 a	6,4 ± 0,6 b	6,6 ± 0,5 ab	6,5 ± 0,4 ab
	rel.	100	91	95	94
SFM	g	0,79 ± 0,04 b	0,96 ± 0,13 a	0,95 ± 0,14 a	1,02 ± 0,12 a
	rel.	100	122	121	129
STM	mg	87 ± 8 a	78 ± 9 ab	73 ± 12 b	79 ± 9 ab
	rel.	100	90	84	91
BF	cm²	18,4 ± 1,6 a	17,3 ± 1,9 a	16,7 ± 3,1 a	18,3 ± 2,3 a
	rel.	100	94	91	100
WL	cm	340,0 ± 12,5 a	159,2 ± 19,6 b	151,8 ± 19,8 b	165,6 ± 10,3 b
	rel.	100	47	45	49
WFM	mg	432 ± 42 a	187 ± 23 b	170 ± 35 b	193 ± 25 b
	rel.	100	43	39	45
WTM	mg	20 ± 0 *	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	rel.	100	50	50	50



## 5.2 Axenische Kultur mit Kulturfiltrat-Fractionen von FZB24

Da der KF-Test zeigte, dass *B. subtilis* offenbar Metabolite produziert, die von der Pflanze innerhalb einiger Tage aufgenommen werden und zu einer gewissen Salztoleranz führten, versuchten wir in axenischen Tests weiter zu klären, ob eventuell bestimmte Fraktionen der KF, besonders hinsichtlich unterschiedlicher Peptidgehalte, welche die hauptsächliche Metabolit-Gruppe von *B. subtilis* sein könnten, möglicherweise mit einer Rolle auf die Salztoleranzerhöhung spielen.

### Fraktionen 8-13 und 14-16

Die Tabelle 3 zeigt den Einfluss der hohen Salinität und die Wirkung der KF-Fraktionen 8-13 und 14-16 auf das Wachstum der Tomatensämlinge.

Die NaCl-Applikation hatte eine negative, statistisch nicht gesicherte Auswirkung auf die Länge und die Trockenmasse des Sprosses, sowie die Blattfläche, die Frischmasse wurde dadurch jedoch signifikant gefördert im Vergleich zur gesunden Kontrolle.

Die Anwendung der KF-Fraktionen führte in allen Konzentrationen zu einer leichten Stimulierung des Sprosswachstums.

Die Salzzuführung bewirkte eine erhebliche Hemmung bei allen Parametern des Wurzelwachstums im Vergleich zur gesunden Kontrolle.

Die Behandlung der Sämlinge mit der KF-Fraktion 14-16 20 % führte, mit einer 10 %-Förderung im Verhältnis zur gestressten Kontrolle, eine signifikante Erhöhung der Wurzellänge herbei (Abbildung 3). Insgesamt hatten die KF-Fraktionen einen positiven Einfluss auf das Wurzelwachstum.

Besonders auffallend ist die KF-Fraktion 14-16 20 %, die auf einen spezifischen positiven Effekt hinweist hinsichtlich der toleranzerhöhenden Wirkung gegenüber Salzstress.

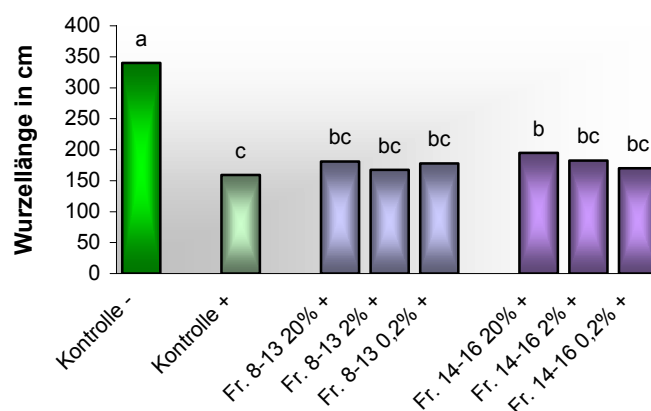


Abb. 3: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 8-13 und 14-16 von FZB24 auf die Wurzellänge von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=5, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Tab. 3: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 8-13 und 14-16 von FZB24 auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit p≤0,05, \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SFM</sub>=0,14, HSD<sub>STM</sub>=13,40, HSD<sub>BF</sub>=2,91, HSD<sub>WL</sub>=34,59, HSD<sub>WFM</sub>=44,90)

		Kontrolle -	Kontrolle +	Fr. 8-13 20% +	Fr. 8-13 2% +	Fr. 8-13 0,2% +	Fr. 14-16 20% +	Fr. 14-16 2% +	Fr. 14-16 0,2% +
SL <sup>1</sup>	cm	7,0±0,4    a	6,4±0,6    a	6,5±0,8    a	6,7±0,2    a	6,4±0,5    a	6,8±0,4    a	6,4±0,4    a	6,5±0,5    a
	rel.	100	91	94	97	92	98	92	94
SFM	g	0,79±0,04   b	0,96±0,13   a	1,03±0,12   a	1,00±0,07   a	1,00±0,07   a	1,07±0,10   a	1,03±0,11   a	1,00±0,12   a
	rel.	100	122	131	127	127	135	130	127
STM	mg	87±8        a	78±9        a	85±11       a	79±6        a	81±9        a	85±11       a	79±10       a	81±12       a
	rel.	100	90	98	91	93	98	91	93
BF	cm²	18,4±1,6    a	17,3±1,9    a	18,9±2,1    a	17,6±1,9    a	17,8±1,7    a	18,9±2,3    a	18,2±1,9    a	18,6±2,9    a
	rel.	100	94	102	95	97	103	99	101
WL	cm	340,0±12,5   a	159,2±19,6   c	180,8±13,9   bc	167,6±13,0   bc	177,8±15,5   bc	195,0±20,3   b	182,2±15,3   bc	170,2±22,3   bc
	rel.	100	47	53	49	52	57	54	50
WFM	mg	432±42      a	187±23      b	209±32      b	200±35      b	220±25      b	216±31      b	219±39      b	223±25      b
	rel.	100	43	48	46	51	50	51	52
WTM	mg	20±0        *	10±0	10±0	10±0	10±0	10±0	10±0	10±0
	rel.	100	50	50	50	50	50	50	50

### **Fraktionen 12-18, 19-25, 26-31 und 32-36**

Die Tabelle 4 stellt den Einfluss des hohen Salzstress und die Wirkung der KF-Fraktionen 12-18, 19-25, 26-31 und 32-36 auf das Wachstum der Testpflanzen dar.

Die Salzapplikation hatte eine signifikant negative Auswirkung auf alle Wachstumsparameter des Sprosses, mit Ausnahme die Frischmasse, welche dadurch leicht erhöht wurde im Vergleich zur gesunden Kontrolle.

Die Behandlung der Pflanzen mit der KF-Fraktion 12-18 0,2 % bewirkte eine erhebliche Stimulierung der Trockenmasse um 18 % gegenüber der gestressten Kontrolle. Die Anwendung der KF-Fraktion 19-25 führte zu einer statistisch bedeutsamen Förderung der Frischmasse um 23 %, der Trockenmasse um 21 % und der Blattfläche um 19 % in der 2 %-Konzentration und der Trockenmasse um 18 % im Verhältnis zur NaCl-Kontrolle in der 0,2 %-Konzentration. Die Behandlung der Sämlinge mit der KF-Fraktion 26-31 zeigte eine statistisch gesicherte Erhöhung der Frischmasse um 24 %, der Trockenmasse um 25 % und der Blattfläche um 22 % in der 20 %-Konzentration, der Trockenmasse um 18 % in der 2 %-Konzentration, und der Länge um 15 %, der Frischmasse um 27 %, der Trockenmasse um 26 % und der Blattfläche um 19 % in der 0,2 %-Konzentration im Vergleich zur gestressten Kontrolle. Die Applikation der KF-Fraktion 32-36 konnte in den Konzentrationen von 2 % und 0,2 % die Trockenmasse der Testpflanzen erheblich erhöhen um 27 % bzw. 18 % gegenüber der salzgestressten Kontrolle. Insgesamt führte die Behandlung der Sämlinge mit den oben genannten KF-Fraktionen in allen angewandten Konzentrationen zu einer Förderung des Sprosswachstums, was bei der Trockenmasse (Abbildung 4) am deutlichsten erkennbar ist.

Der Stressfaktor bewirkte eine Hemmung der Wachstumsparameter der Wurzel im Verhältnis zur gesunden Kontrolle, die mit Ausnahme der Trockenmasse statistisch gesichert war.

Die Behandlung der Sämlinge mit der KF-Fraktion 19-25 in der 0,2 %-Konzentration und der KF-Fraktion 32-36 in der 2 %-Konzentration führte zu einer signifikanten Förderung der Frischmasse um jeweils beachtliche 19 % gegenüber der gestressten Kontrolle (Abbildung 5). Insgesamt war der beim Sprosswachstum beobachtete positive Einfluss der getesteten KF-Fraktionen auch beim Wurzelwachstum der Pflanzen erkennbar, mit Ausnahme die Trockenmasse, die sich auch hier als unempfindlicher Parameter erwies angesichts des jungen Alters der Pflanzen.

Hervorhebenswert sind die KF-Fraktionen 19-25 und 26-31 in der 0,2 %-Konzentration und die KF-Fraktion 32-36 in der 2 %-Konzentration, deren Wirkung spezielle Effekte dieser KF-Fraktionen in den jeweiligen Konzentrationen belegt, welche eine indikative Rolle bei der beobachteten Toleranzerhöhung der Testpflanzen gegenüber Salinität spielen könnten.

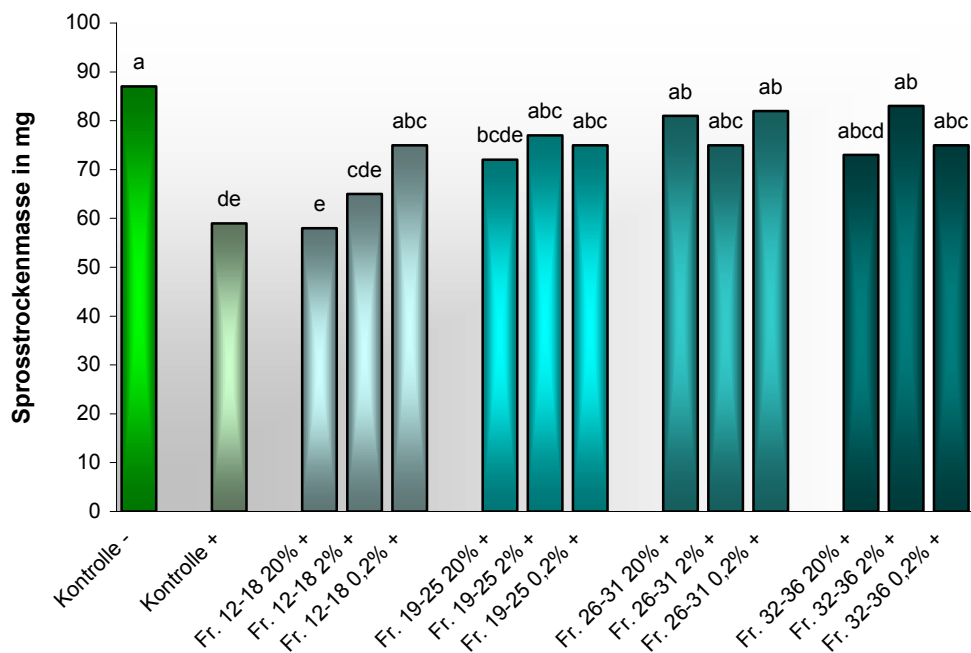


Abb. 4: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 12-18, 19-25, 26-31 und 32-36 von FZB24 auf die Sprosstrockenmasse von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

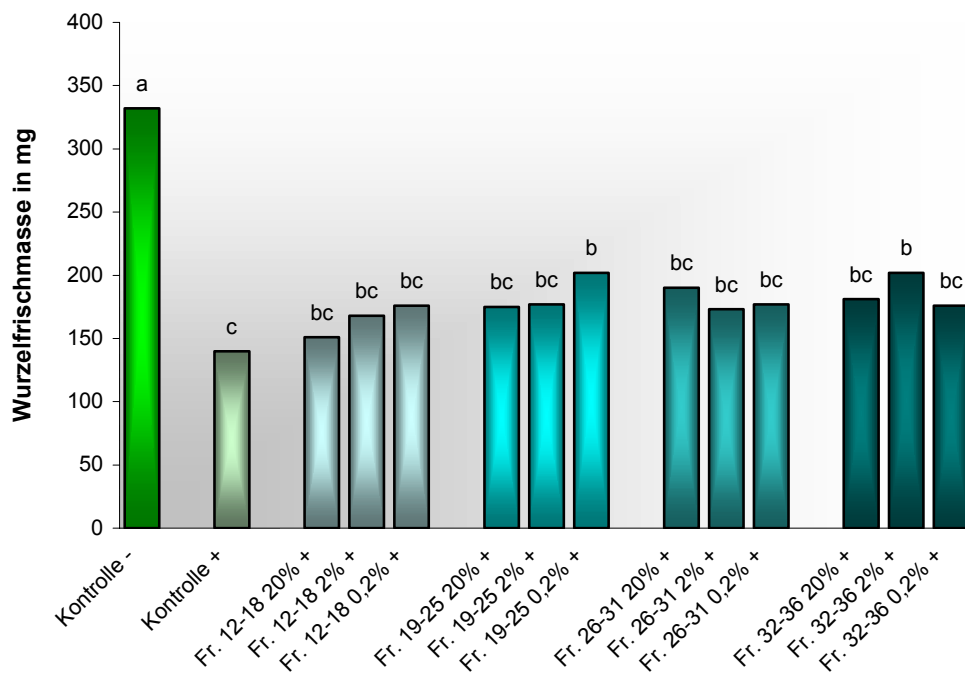


Abb. 5: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 12-18, 19-25, 26-31 und 32-36 von FZB24 auf die Wurzelfrischmasse von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Tab. 4: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fraktionen 12-18, 19-25, 26-31 und 32-36 von FZB24 auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SL</sub>=0,83, HSD<sub>SFM</sub>=0,19, HSD<sub>STM</sub>=14,11, HSD<sub>BF</sub>=3,54, HSD<sub>WFM</sub>=58,50)

		Kontrolle -	Kontrolle +	Fr. 12-18 20% +	Fr. 12-18 2% +	Fr. 12-18 0,2% +	Fr. 19-25 20% +	Fr. 19-25 2% +
<b>SL</b>	cm	6,6±0,6 a	5,7±0,6 b	6,0±0,7 ab	5,9±0,4 ab	6,3±0,5 ab	6,3±0,4 ab	6,3±0,5 ab
	rel.	100	86	90	88	94	96	95
<b>SFM</b>	g	0,82±0,06 b	0,84±0,16 b	0,83±0,08 b	0,88±0,14 ab	0,96±0,10 ab	1,00±0,09 ab	1,03±0,18 a
	rel.	100	103	102	108	117	122	126
<b>STM</b>	mg	87±9 a	59±11 de	58±4 e	65±10 cde	75±8 abc	72±6 bcde	77±11 abc
	rel.	100	68	67	75	86	83	89
<b>BF</b>	cm <sup>2</sup>	19,8±1,7 a	15,4±3,5 c	15,9±2,0 bc	16,4±2,4 abc	17,6±2,4 abc	18,4±1,9 abc	19,1±3,1 ab
	rel.	100	78	80	83	89	93	97
<b>WL<sup>1</sup></b>	cm	322,4±22,8 a	151,6±5,0 b	162,2±17,5 ab	157,4±24,3 ab	157,4±13,4 ab	154,4±20,0 ab	161,2±11,3 ab
	rel.	100	47	50	49	49	48	50
<b>WFM</b>	mg	332±59 a	140±42 c	151±28 bc	168±39 bc	176±30 bc	175±27 bc	177±36 bc
	rel.	100	42	45	51	53	53	53
<b>WTM</b>	mg	14±5	10±0	10±0	10±0	10±0	10±0	10±0
	rel.	100	71	71	71	71	71	71

Fortsetzung Tab. 4: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 12-18, 19-25, 26-31 und 32-36 von FZB24 auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SL</sub>=0,83, HSD<sub>SFM</sub>=0,19, HSD<sub>STM</sub>=14,11, HSD<sub>BF</sub>=3,54, HSD<sub>WFM</sub>=58,50)

		Fr. 19-25 0,2% +	Fr. 26-31 20% +	Fr. 26-31 2% +	Fr. 26-31 0,2% +	Fr. 32-36 20% +	Fr. 32-36 2% +	Fr. 32-36 0,2% +
SL	cm	6,4 ± 0,5 ab	6,5 ± 0,6 ab	6,2 ± 0,4 ab	6,7 ± 0,7 a	6,1 ± 0,4 ab	6,2 ± 0,7 ab	6,0 ± 0,4 ab
	rel.	96	98	94	101	92	93	91
SFM	g	0,97 ± 0,06 ab	1,04 ± 0,16 a	0,98 ± 0,12 ab	1,06 ± 0,20 a	0,95 ± 0,11 ab	1,00 ± 0,11 ab	0,94 ± 0,11 ab
	rel.	119	127	120	130	116	123	115
STM	mg	75 ± 5 abc	81 ± 10 ab	75 ± 11 abc	82 ± 14 ab	73 ± 8 abcd	83 ± 8 ab	75 ± 11 abc
	rel.	86	93	86	94	84	95	86
BF	cm <sup>2</sup>	18,6 ± 1,0 abc	19,8 ± 2,5 a	18,0 ± 2,3 abc	19,1 ± 3,0 ab	17,5 ± 2,2 abc	18,9 ± 1,5 abc	18,2 ± 2,2 abc
	rel.	94	100	91	97	89	95	92
WL <sup>1</sup>	cm	176,2 ± 22,8 ab	168,8 ± 10,6 ab	164,8 ± 26,5 ab	161,0 ± 14,9 ab	161,0 ± 14,7 ab	143,6 ± 5,7 b	170,6 ± 10,4 ab
	rel.	55	52	51	50	50	45	53
WFM	mg	202 ± 42 b	190 ± 24 bc	173 ± 54 bc	177 ± 26 bc	181 ± 46 bc	202 ± 34 b	176 ± 42 bc
	rel.	61	57	52	53	55	61	53
WTM	mg	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	rel.	71	71	71	71	71	71	71

### Fraktionen 37-41 und batch-50

Der Einfluss der hohen Salzbelastung und die Wirkung der KF-Fraktionen 37-41 und batch-50 auf das Wachstum der Tomatensämlinge ist in der Tabelle 5 dargestellt.

Die Introduktion des Stressors führte zu einer erheblichen Hemmung der Länge und der Trockenmasse des Sprosses, sowie der Blattfläche der Testpflanzen gegenüber der gesunden Kontrolle.

Die Anwendung der KF-Fraktion batch-50 bewirkte eine statistisch bedeutsame Erhöhung der Trockenmasse um 19 % in der 20 %-Konzentration und der Frischmasse um 24 % im Verhältnis zur gestressten Kontrolle in der 2 %-Konzentration. Tendenziell wurde auch hier eine Förderung des Sprosswachstums erzielt durch die Behandlung der Pflanzen mit den KF-Fraktionen in allen Konzentrationen.

Die Applikation des Stressfaktors führte eine statistisch gesicherte Reduzierung der Länge, der Frischmasse und der Trockenmasse der Wurzel im Vergleich zur gesunden Kontrolle herbei.

Die Behandlung der Sämlinge mit der KF-Fraktion batch-50 konnte in der 2 %-Konzentration die Wurzellänge signifikant erhöhen mit einer beachtlichen 23 %-Förderung gegenüber der salzgestressten Kontrolle (Abbildung 6). Insgesamt wurde wie beim Spross, auch bei der Wurzel eine Stimulierung des Wachstums durch die Applikation dieser KF-Fraktionen in allen angewandten Konzentrationen beobachtet.

Herausragend ist hier die KF-Fraktion batch-50 in der 2 %-Konzentration mit zumeist positiven Effekten hinsichtlich der wachstumsfördernden Wirkung unter Salzstress, die bisheriges untermauert, d. h. von bestimmten KF-Fraktionen gehen Toleranzerhöhungseffekte aus, denen allerdings nur eine indikative Bedeutung beigemessen werden kann.

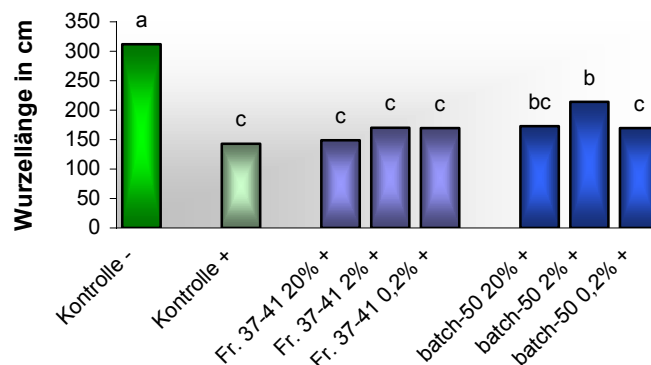


Abb. 6: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fraktionen 37-41 und batch-50 von FZB24 auf die Wurzellänge von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=5, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Tab. 5: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 37-41 und batch-50 von FZB24 auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit p≤0,05, \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SL</sub>=0,68, HSD<sub>SFM</sub>=0,20, HSD<sub>STM</sub>=16,35, HSD<sub>WL</sub>=42,70)

		Kontrolle -	Kontrolle +	Fr. 37-41 20% +	Fr. 37-41 2% +	Fr. 37-41 0,2% +	batch-50 20% +	batch-50 2% +	batch-50 0,2% +
SL	cm	7,2±0,5    a	6,1±0,5    b	6,1±0,4    b	6,6±0,4    ab	6,3±0,7    b	6,5±0,4    ab	6,2±0,5    b	6,2±0,4    b
	rel.	100	86	86	92	88	91	87	87
SFM	g	0,88±0,08   ab	0,87±0,23   b	0,96±0,09   ab	1,07±0,14   ab	0,97±0,23   ab	1,07±0,08   ab	1,08±0,13   a	1,00±0,07   ab
	rel.	100	99	109	122	111	122	123	114
STM	mg	96±11       a	68±18       c	79±7       bc	81±10       abc	77±18       bc	86±8       ab	81±10       abc	78±4       bc
	rel.	100	71	82	84	80	90	84	81
BF <sup>1</sup>	cm <sup>2</sup>	21,0±1,4    a	15,4±6,2    b	17,4±2,4    b	19,9±2,8    ab	17,3±5,6    ab	19,3±2,2    ab	19,6±3,1    ab	17,9±1,8    b
	rel.	100	73	83	95	83	92	93	85
WL	cm	312,2±24,4   a	143,0±19,1   c	149,0±8,5    c	170,2±28,7   c	169,4±18,2   c	172,6±11,7   bc	214,4±32,5   b	169,8±9,7    c
	rel.	100	46	48	55	54	55	69	54
WFM <sup>1</sup>	mg	397 ±55       a	165±48       b	184±30       b	211±34       b	220±67       b	222±48       b	256±78       ab	199±24       b
	rel.	100	42	46	53	55	56	64	50
WTM	mg	16±5       *	10±0	10±0	10±0	10±0	10±0	10±0	10±0
	rel.	100	63	63	63	63	63	63	63



### 5.3 Axenische Kultur mit Peptidextrakt von FZB41

Aufbauend auf den bisherigen Erfahrungen mit den KF-Fractionen, sollte nun mit einem eindeutigen Peptideinsatz, als spezielle Metaboliten von *B. subtilis*, eine mögliche Rolle als Salztoleranzerhöher geprüft werden.

Die Tabelle 6 zeigt den Einfluss der hohen Salinität und die Wirkung des PE auf das Wachstum der Testpflanzen.

Der Stressor hatte eine negative, mit Ausnahme der Frischmasse erhebliche Auswirkung auf die Wachstumsparameter des Sprosses im Vergleich zur gesunden Kontrolle.

Die Anwendung des PE (Peptidextrakt) führte zu einer signifikanten Hemmung der Länge um 20 %, der Frischmasse um 46 % und der Trockenmasse um 36 % bei der 100 µg/ml-Konzentration und einer statistisch gesicherten Erhöhung der Trockenmasse um 19 % (Abbildung 7) gegenüber der Salzkontrolle bei der 0,1 µg/ml-Konzentration. Insgesamt bewirkte das PE eine Förderung des Sprosswachstums mit Ausnahme die höchste Konzentration, die eine hemmende Wirkung zeigte.

Die NaCl-Applikation führte zu einer statistisch bedeutsamen Hemmung der Parameter des Wurzelwachstums im Verhältnis zur gesunden Kontrolle.

Die Behandlung der Pflanzen mit dem PE bewirkte eine erhebliche Stimulierung der Frischmasse um 15 % bei der 0,1 µg/ml-Konzentration und der Länge um 14 % gegenüber der Salzkontrolle bei der 0,001 µg/ml-Konzentration. Auch das Wurzelwachstum wurde insgesamt durch das PE gefördert, außer bei der höchsten Konzentration.

Betonenswert ist die 0,1 µg/ml-Konzentration des PE, welche die meisten positiven Effekten aufwies und eine toleranzerhöhende Wirkung der Peptide unter Salzbedingungen unterstreicht.

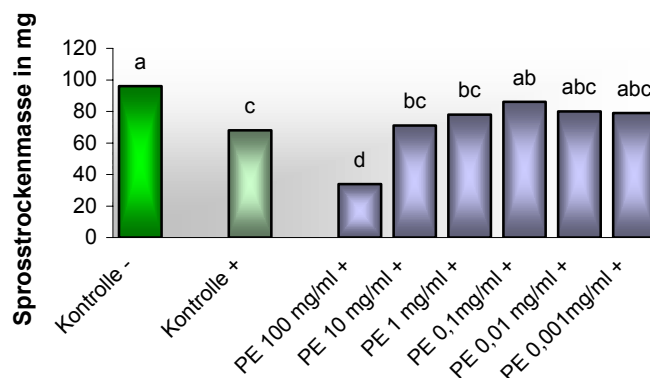


Abb. 7: Wirkung einer Wurzelapplikation des Peptidextraktes von FZB41 auf die Sprosstrockenmasse von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Tab. 6: Wirkung einer Wurzelapplikation des Peptidextraktes von FZB41 auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit p≤0,05, \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SL</sub>=0,82, HSD<sub>SFM</sub>=0,23, HSD<sub>STM</sub>=17,89, HSD<sub>WL</sub>=40,56, HSD<sub>WFM</sub>=58,60)

[illegible]

#### 5.4 Axenische Kultur mit Auxinen

Bisher wurde eine komplexe Rolle von bestimmten Metaboliten aus *B. subtilis* nachgewiesen, die als Salztoleranz-Erhöher erscheinen. Nach unseren Untersuchungen könnten Proteine in diesem Geschehen beteiligt sein. In Form von speziellen Peptiden wäre ein Effekt denkbar, aber es ist schwer abzuleiten, welcher Prozess der Salztoleranz begünstigt wird durch diese Elicitor-Wirkung. Näher liegt diese Deutungsmöglichkeit bei Substanzen, die das Wachstum direkt beeinflussen.

##### Wurzelapplikation von TRP, IPyA, IAAld und IAA

Der Einfluss des hohen Salzstress und die Wirkung der Auxin-Präkursoren Tryptophan (TRP), Indol-3-pyruvat (IPyA), Indol-3-acetaldehyd (IAAld) und der Indol-3-essigsäure (IAA) auf das Wachstum der Sämlinge wird in der Tabelle 7 dargestellt.

Die Salzzuführung bewirkte eine signifikante Hemmung der Spross trockenmasse und der Blattfläche gegenüber der gesunden Kontrolle.

Die Anwendung der Auxin-Präkursoren hatte keine statistisch gesicherten Auswirkungen auf das Sprosswachstum, führte aber in den meisten Fällen zu einer leichten Förderung im Vergleich zur salzgestressten Kontrolle. Die Applikation des Auxins in der  $10^{-5}$  M-Konzentration führte dagegen eine erhebliche Reduzierung der Länge um 14 %, der Frischmasse um 28 % und der Trockenmasse um 19 % gegenüber der NaCl-Kontrolle herbei. Insgesamt zeigte die Behandlung der Pflanzen mit dem Auxin eine stark hemmende Wirkung in der Konzentration von  $10^{-5}$  M und eine leicht fördernde Wirkung auf das Sprosswachstum in der Konzentration von  $10^{-10}$  M.

Die Introduktion des Stressors führte zu einer statistisch bedeutsamen Hemmung der Parameter des Wurzelwachstums im Verhältnis zur gesunden Kontrolle.

Die Behandlung der Sämlinge mit IPyA bewirkte in der  $10^{-5}$  M-Konzentration eine signifikante Erhöhung der Länge mit einer 19 %-Förderung gegenüber der gestressten Kontrolle. Die Anwendung von IAAld in der  $10^{-10}$  M-Konzentration konnte mit einer 13 %-Förderung die Länge und einer beachtlichen 28 %-Förderung gegenüber der NaCl-Kontrolle die Trockenmasse erheblich erhöhen. Insgesamt bewirkte die Behandlung der Pflanzen mit den Auxin-Präkursoren, mit Ausnahme von TRP  $10^{-7}$  M, eine Stimulierung des Wurzelwachstums. Das Auxin zeigte keine eindeutige Wirkung.

Besonders auffallend sind IPyA  $10^{-5}$  M und IAAld  $10^{-10}$  M, da diese Auxin-Präkursoren in den jeweiligen Konzentrationen die häufigsten wachstumsfördernden und zugleich toleranzerhöhenden Effekte gegenüber Salzstress zeigten, die insbesondere bei den Parametern Wurzellänge (Abbildung 8) und Wurzeltrockenmasse (Abbildung 9) erkennbar sind. Das Auxin selbst wies keine vergleichbare Wirkung auf.

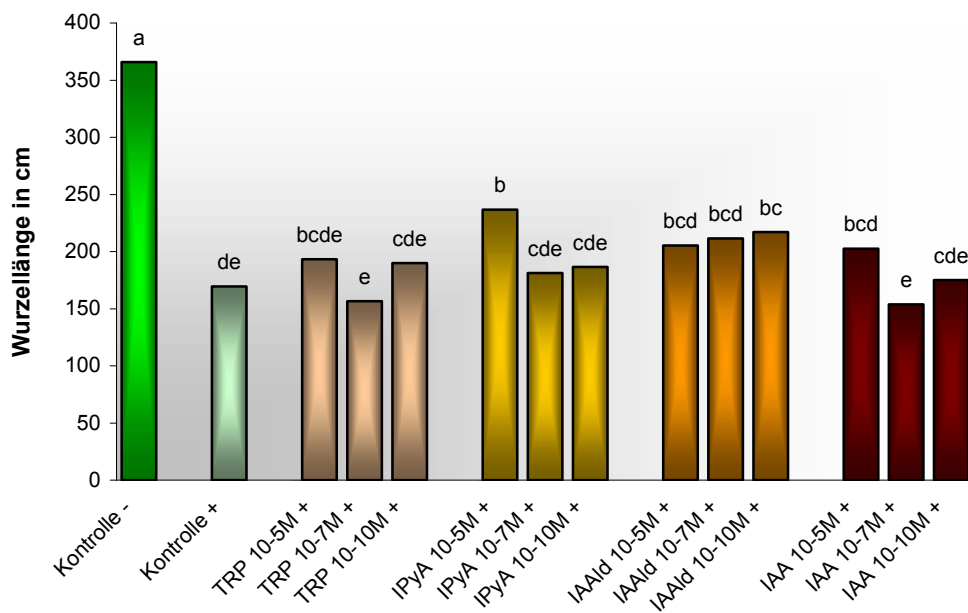


Abb. 8: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzellänge von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-: ohne NaCl, +: mit NaCl, n=5, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

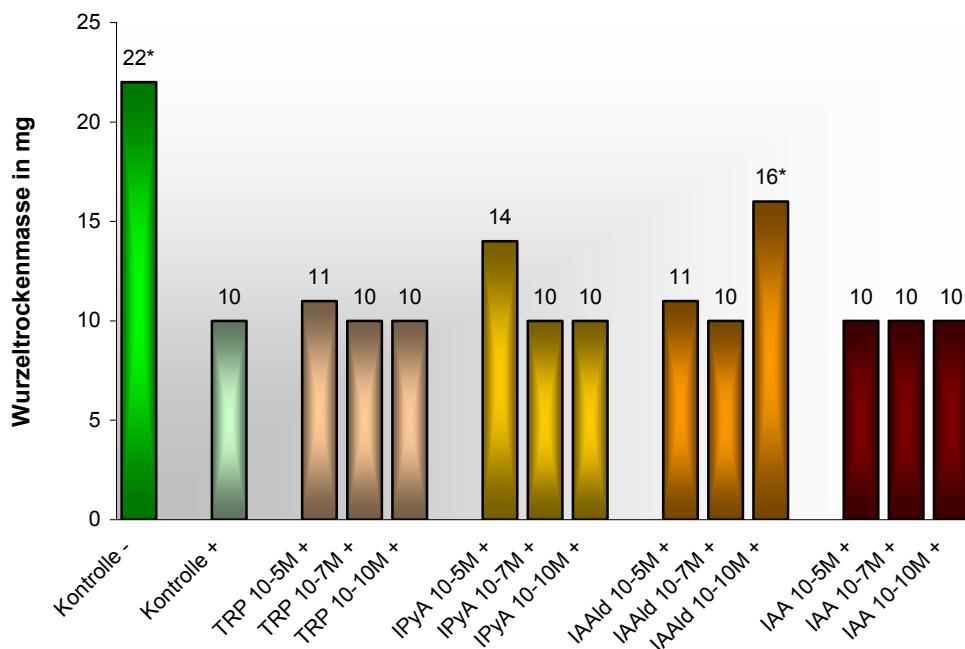


Abb. 9: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzeltrockenmasse von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-: ohne NaCl, +: mit NaCl, n=10, \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Tab. 7: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit p≤0,05, \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SL</sub>=0,82, HSD<sub>SFM</sub>=0,17, HSD<sub>STM</sub>=13,65, HSD<sub>WL</sub>=45,37)

		Kontrolle -	Kontrolle +	TRP 10 <sup>-5</sup> M +	TRP 10 <sup>-7</sup> M +	TRP 10 <sup>-10</sup> M +	IPyA 10 <sup>-5</sup> M +	IPyA 10 <sup>-7</sup> M +
<b>SL</b>	cm	7,1±0,4 a	6,3±0,7 abc	6,5±0,5 ab	6,2±0,3 bc	6,2±0,6 bc	5,5±0,5 cd	6,5±0,4 ab
	rel.	<b>100</b>	<b>89</b>	<b>91</b>	<b>87</b>	<b>88</b>	<b>78</b>	<b>93</b>
<b>SFM</b>	g	0,87±0,06 bc	0,98±0,08 ab	1,02±0,11 ab	0,99±0,13 ab	1,02±0,13 ab	0,91±0,13 abc	1,01±0,10 ab
	rel.	<b>100</b>	<b>113</b>	<b>117</b>	<b>114</b>	<b>117</b>	<b>104</b>	<b>116</b>
<b>STM</b>	mg	92±11 a	71±6 b	78±9 b	73±9 b	74±10 b	72±8 b	75±10 b
	rel.	<b>100</b>	<b>77</b>	<b>85</b>	<b>79</b>	<b>80</b>	<b>78</b>	<b>82</b>
<b>BF<sup>1</sup></b>	cm <sup>2</sup>	23,5±2,3 a	17,9±1,6 b	19,3±2,5 ab	18,8±2,4 b	19,2±2,4 ab	18,6±2,4 b	20,6±2,8 ab
	rel.	<b>100</b>	<b>76</b>	<b>82</b>	<b>80</b>	<b>82</b>	<b>79</b>	<b>87</b>
<b>WL</b>	cm	365,8±22,2 a	169,6±21,1 de	193,4±13,6 bcde	156,6±22,7 e	189,8±9,0 cde	236,8±22,7 b	181,2±29,7 cde
	rel.	<b>100</b>	<b>46</b>	<b>53</b>	<b>43</b>	<b>52</b>	<b>65</b>	<b>50</b>
<b>WFM<sup>1</sup></b>	mg	416±40 a	189±30 bc	215±42 bc	184±34 bc	194±38 bc	254±45 ab	225±37 abc
	rel.	<b>100</b>	<b>45</b>	<b>52</b>	<b>44</b>	<b>47</b>	<b>61</b>	<b>54</b>
<b>WTM</b>	mg	22±4 *	10±0	11±3	10±0	10±0	14±5	10±0
	rel.	<b>100</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>45</b>	<b>45</b>	<b>64</b>	<b>45</b>

Fortsetzung Tab. 7: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit p≤0,05, \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SL</sub>=0,82, HSD<sub>SFM</sub>=0,17, HSD<sub>STM</sub>=13,65, HSD<sub>WL</sub>=45,37)

		IPyA 10 <sup>-10</sup> M +	IAAld 10 <sup>-5</sup> M +	IAAld 10 <sup>-7</sup> M +	IAAld 10 <sup>-10</sup> M +	IAA 10 <sup>-5</sup> M +	IAA 10 <sup>-7</sup> M +	IAA 10 <sup>-10</sup> M +
<b>SL</b>	cm	6,4±0,6 ab	6,7±0,4 ab	6,6±0,5 ab	6,6±0,7 ab	5,3±0,7 d	6,3±0,5 abc	6,7±0,7 ab
	rel.	<b>91</b>	<b>94</b>	<b>94</b>	<b>94</b>	<b>75</b>	<b>89</b>	<b><u>95</u></b>
<b>SFM</b>	g	1,00±0,13 ab	0,96±0,10 ab	1,01±0,09 ab	1,04±0,14 a	0,74±0,12 c	0,97±0,12 ab	1,02±0,10 ab
	rel.	<b>115</b>	<b>110</b>	<b>116</b>	<b><u>119</u></b>	<b>85</b>	<b>111</b>	<b>117</b>
<b>STM</b>	mg	73±9 b	76±10 b	81±9 ab	77±9 b	53±12 c	72±6 b	75±7 b
	rel.	<b>79</b>	<b>83</b>	<b><u>88</u></b>	<b>84</b>	<b>58</b>	<b>78</b>	<b>82</b>
<b>BF<sup>1</sup></b>	cm <sup>2</sup>	19,3±2,1 ab	19,1±2,2 ab	19,9±1,5 ab	19,9±4,1 ab	15,8±2,9 b	18,5±1,4 b	19,4±1,8 ab
	rel.	<b>82</b>	<b>81</b>	<b>85</b>	<b>85</b>	<b>67</b>	<b>79</b>	<b>82</b>
<b>WL</b>	cm	186,6±11,3 cde	205,4±20,2 bcd	211,4±5,3 bcd	217,2±26,7 bc	202,4±34,2 bcd	153,8±14,9 e	175,2±9,1 cde
	rel.	<b>51</b>	<b>56</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>55</b>	<b>42</b>	<b>48</b>
<b>WFM<sup>1</sup></b>	mg	206±23 bc	228±30 abc	231±26 ab	243±62 abc	170±28 c	188±15 bc	187±33 bc
	rel.	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	<b>58</b>	<b>41</b>	<b>45</b>	<b>45</b>
<b>WTM</b>	mg	10±0	11±3	10±0	16±5 *	10±0	10±0	10±0
	rel.	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>45</b>	<b><u>73</u></b>	<b>45</b>	<b>45</b>	<b>45</b>

Die Salzapplikation hatte einen negativen Einfluss auf den Wassergehalt aller pflanzlichen Teile. Sie führte zu einer Hemmung des Wassergehaltes um 3,9 % im Apex bzw. um 6,3 % in den Blättern gegenüber der gesunden Kontrolle. Im Stängel und in der Wurzel war diese Abnahme weniger ausgeprägt und betrug 0,9 % und 0,1 % im Verhältnis zu der gesunden Kontrolle.

Die Behandlung der Pflanzen mit TRP  $10^{-10}$  M und IAAld  $10^{-5}$  M bewirkte eine Erhöhung des Wassergehaltes um jeweils 1,7 % in den jungen, sich noch entwickelnden Blättern, während die Behandlung mit IAA  $10^{-5}$  M den Wassergehalt des Apex um 4,5 % gegenüber der gestressten Kontrolle reduzierte (Abbildung 10). In den schon entwickelten Blättern war keine Regulierung des Wassergehaltes durch die Anwendung des Phytohormons und seiner Vorstufen ersichtlich. Die Applikation von IAA  $10^{-5}$  M reduzierte dagegen zusätzlich den Wassergehalt der Blätter um 1,8 % im Vergleich zu der NaCl-Kontrolle (Abbildung 11). Im Stängel der Pflanzen wurden ebenfalls keine nennenswerten Veränderungen beobachtet, außer eine weitere Abnahme des Wassergehaltes durch die Anwendung von IPyA  $10^{-5}$  M um 0,9 % und IAA  $10^{-5}$  M um 1,2 % gegenüber der salzgestressten Kontrolle (Abbildung 12). In der Wurzel führte die Behandlung der Sämlinge mit IPyA  $10^{-5}$  M zu einer Erhöhung des Wassergehaltes um 0,8 % gegenüber der gestressten Kontrolle. Die Applikation von IAA  $10^{-5}$  M führte dagegen eine Hemmung des Wassergehaltes um 1,2 % im Verhältnis zu der salzgestressten Kontrolle herbei (Abbildung 13).

Insgesamt wurde eine Förderung des Wassergehaltes durch die Auxin-Präkursoren TRP, IPyA und IAAld im Apex und in der Wurzel der Testpflanzen beobachtet. Das Auxin hatte dagegen ein negativen Einfluss auf den Wassergehalt der Sämlinge, insbesondere in der Konzentration von  $10^{-5}$  M.

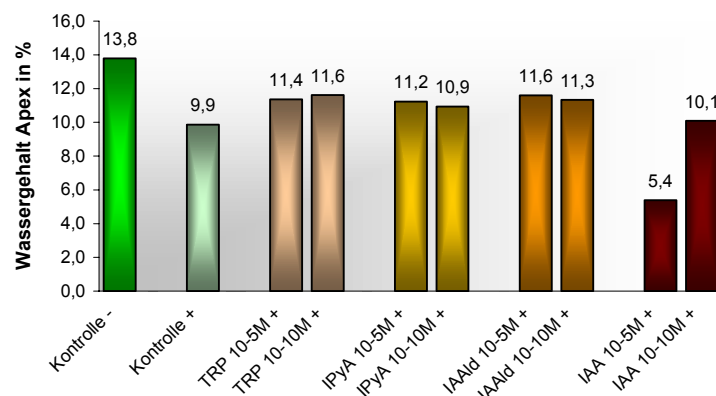


Abb. 10: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt des Apex von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert den durchschnittlichen Wassergehalt von 10 Pflanzen)

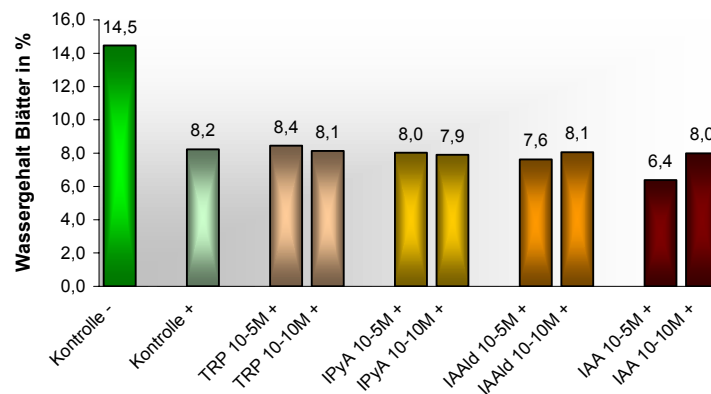


Abb. 11: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt der Blätter von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert den durchschnittlichen Wassergehalt von 10 Pflanzen)

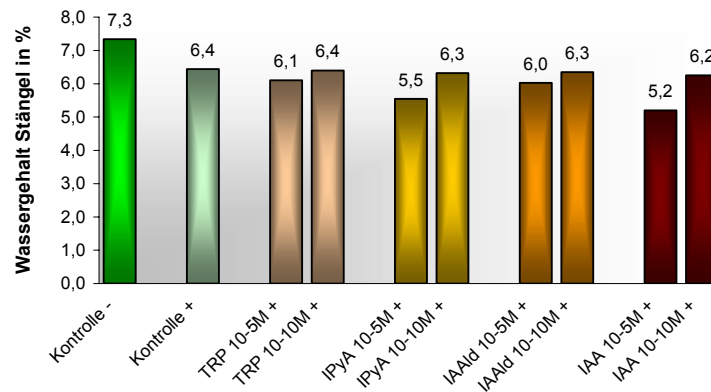


Abb. 12: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt des Stängels von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert den durchschnittlichen Wassergehalt von 10 Pflanzen)

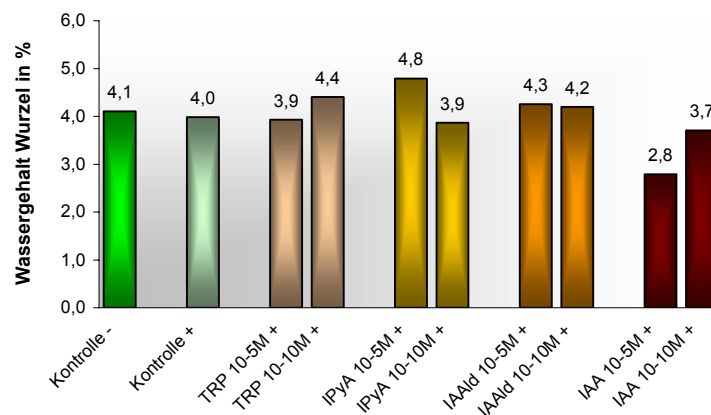


Abb. 13: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt der Wurzel von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert den durchschnittlichen Wassergehalt von 10 Pflanzen)



### **Wurzelapplikation von TAM und IAM**

Die Tabelle 8 zeigt den Einfluss der hohen Salzbelastung und die Wirkung der Auxin-Präkursoren Tryptamin (TAM) und Indol-3-acetamid (IAM) auf das Wachstum der Testpflanzen.

Die Introduktion des Stressfaktors führte zu einer signifikanten Hemmung der Länge und der Trockenmasse des Sprosses gegenüber der gesunden Kontrolle, sowie der Blattfläche. Die Sprossfrischmasse der Sämlinge wurde dagegen dadurch leicht erhöht.

Die Behandlung der Pflanzen mit TAM bewirkte in der  $10^{-10}$  M-Konzentration eine statistisch gesicherte Förderung der Frischmasse und der Blattfläche (Abbildung 14) um jeweils 18 % im Vergleich zur salzgestressten Kontrolle. Die Applikation von IAM führte bei der  $10^{-7}$  M-Konzentration eine erhebliche Erhöhung der Trockenmasse um 14 % und der Blattfläche um 13 % gegenüber der NaCl-Kontrolle herbei. Insgesamt führte die Anwendung dieser Auxin-Präkursoren zu einer Stimulierung des Sprosswachstums, mit Ausnahme von IAM in der  $10^{-5}$  M-Konzentration, die eine hemmende Wirkung zeigte.

Die Applikation von NaCl hatte eine negative, statistisch gesicherte Auswirkung auf alle untersuchten Parameter des Wurzelwachstums im Verhältnis zur gesunden Kontrolle.

Durch die Anwendung von TAM in der  $10^{-5}$  M-Konzentration konnte eine signifikante Förderung der Frischmasse um beachtliche 26 % im Vergleich zur gestressten Kontrolle erzielt werden (Abbildung 15). Die Behandlung der Pflanzen mit IAM führte bei der  $10^{-5}$  M-Konzentration zu einer erheblichen Förderung der Länge um 18 % und Frischmasse um 17 % gegenüber der NaCl-Kontrolle. Insgesamt bewirkte die Anwendung von TAM und IAM eine Förderung des Wurzelwachstums in allen angewandten Konzentrationen.

Hervorhebenswert sind TAM in den Konzentrationen von  $10^{-5}$  M und  $10^{-10}$  M und IAM in der Konzentration von  $10^{-7}$  M mit den meisten positiven Effekten, die eine durch diese bestimmten Konzentrationen der Präkursoren hervorgerufene Salztoleranzerhöhung bei der Testpflanze belegen.

Insgesamt ist durch die Wurzelapplikation der Auxine und insbesondere der Auxin-Präkursoren eine Wachstumsstimulierung, vorrangig im Wurzelbereich und zugleich eine Toleranzerhöhung bei der Testpflanze gegenüber hohem Salzstress sichtbar. Dies verdeutlicht, dass die Zugabe von IAA-Präkursoren im Prozess der pflanzlichen Auxin-Synthese eingreifen und zur verstärkten Biosynthese des Phytohormons führen könnte. Infolgedessen wäre ein stärkeres Wurzelwachstum denkbar, dass die Wasseraufnahme erleichtert, die durch Salz negativ beeinflusst wird und offensichtlich einen höheren Wassergehalt herbeiführt, der besonders im Apex (Abbildung 10) und in der Wurzel (Abbildung 13) der Testpflanze erkennbar ist.

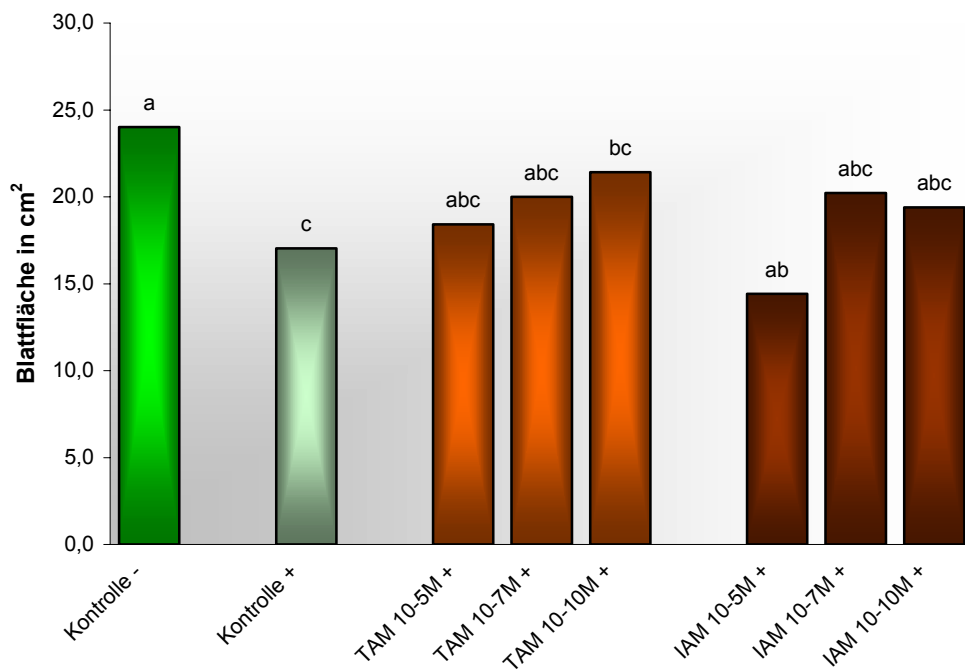


Abb. 14: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptamin und Indol-3-acetamid auf die Blattfläche von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

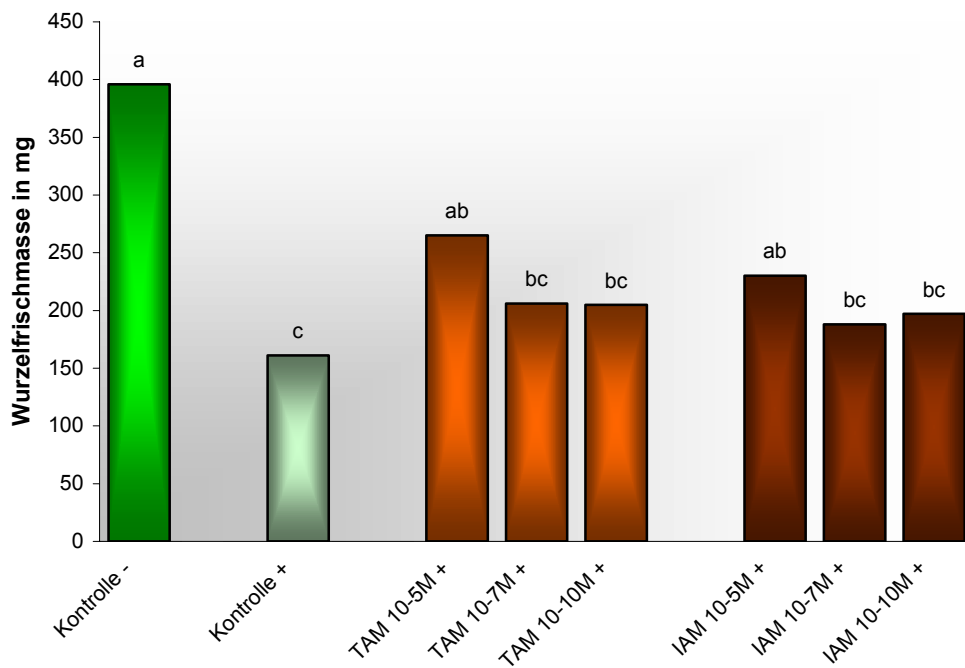


Abb. 15: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptamin und Indol-3-acetamid auf die Wurzelfrischmasse von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Kruskal-Wallis-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Tab. 8: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptamin und Indol-3-acetamid auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit p≤0,05, \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SL</sub>=0,76, HSD<sub>BF</sub>=3,10)

		Kontrolle -	Kontrolle +	TAM 10 <sup>-5</sup> M +	TAM 10 <sup>-7</sup> M +	TAM 10 <sup>-10</sup> M +	IAM 10 <sup>-5</sup> M +	IAM 10 <sup>-7</sup> M +	IAM 10 <sup>-10</sup> M +
SL	cm	7,7±0,5 a	6,5±0,3 b	6,4±0,7 b	6,5±0,5 b	6,6±0,4 b	6,6±0,9 b	6,8±0,5 b	6,5±0,4 b
	rel.	100	84	83	84	85	86	<u>89</u>	84
SFM <sup>1</sup>	g	0,93±0,05 cd	0,99±0,05 bcd	1,00±0,09 abcd	1,09±0,12 ab	1,15±0,07 a	0,88±0,12 d	1,10±0,11 ab	1,09±0,13 abc
	rel.	100	105	107	117	<u>123</u>	95	118	117
STM <sup>1</sup>	mg	98±6 a	71±3 cd	75±8 bcd	81±7 abc	81±3 abc	62±10 d	84±5 ab	82±10 abc
	rel.	100	72	77	83	83	63	<u>86</u>	84
BF	cm <sup>2</sup>	24,0±1,8 a	17,0±2,1 cd	18,4±1,9 bc	20,0±3,3 bc	21,4±1,7 ab	14,4±2,7 d	20,2±0,9 b	19,4±2,5 bc
	rel.	100	71	77	83	<u>89</u>	60	84	81
WL <sup>1</sup>	cm	311,4±27,1 a	135,8±15,8 c	153,6±8,4 abc	161,8±27,4 abc	149,4±22,5 bc	192,0±11,6 ab	151,4±17,6 abc	157,8±19,6 abc
	rel.	100	44	49	52	48	<u>62</u>	49	51
WFM <sup>1</sup>	mg	396±48 a	161±11 c	265±48 ab	206±22 bc	205±47 bc	230±55 ab	188±28 bc	197±53 bc
	rel.	100	41	<u>67</u>	52	52	58	47	50
WTM	mg	18±4 *	10±0	11±3	10±0	10±0	10±0	10±0	10±0
	rel.	100	56	<u>61</u>	56	56	56	56	56

### **Blattapplikation von TRP und IPyA**

Da offensichtlich die Auxin-Präkursoren salztoleranzerhöhend bei den Pflanzen zu wirken scheinen, sollte neben der Aufnahme durch die Wurzel auch eine Aufnahme durch das Blatt geprüft werden.

Der Einfluss der hohen Salinität und die Wirkung einer Blattapplikation der Auxin-Präkursoren Tryptophan (TRP) und Indol-3-pyruvat (IPyA) auf das Wachstum der Pflanzen ist in der Tabelle 9 dargestellt.

Die Applikation des Stressfaktors wirkte sich signifikant negativ auf die Länge und die Trockenmasse des Sprosses, sowie die Blattfläche der Sämlinge im Verhältnis zur gesunden Kontrolle aus. Auf die Sprossfrischmasse dagegen war durch die Salzapplikation keine statistisch bedeutsame Veränderung zu verzeichnen.

Die Behandlung mit TRP in der  $10^{-5}$  M-Konzentration führte zu einer erheblichen Erhöhung der Frischmasse um 38 %, der Trockenmasse um 20 % und der Blattfläche um 30 % gegenüber der NaCl-Kontrolle. Auch die Anwendung von TRP in der  $10^{-7}$  M-Konzentration erbrachte eine statistisch bedeutsame Förderung der Frischmasse um 33 % und der Blattfläche um 21 % im Vergleich zu der gestressten Kontrolle. Die Behandlung der Sämlinge mit IPyA in der Konzentration von  $10^{-5}$  M konnte lediglich die Frischmasse signifikant erhöhen um 29 % im Verhältnis zur salzgestressten Kontrolle. Insgesamt führte die Blattapplikation dieser Auxin-Präkursoren zu einer Stimulierung des Sprosswachstums bei allen untersuchten Parametern und angewandten Konzentrationen.

Der Einfluss von 150 mM NaCl und die Wirkung der Blattapplikation von TRP und IPyA in den physiologischen Konzentrationen von  $10^{-5}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-10}$  M auf die Blattfläche der Sämlinge ist in der Abbildung 16 dargestellt.

Die Introduktion des Stressors bewirkte eine signifikante Hemmung gegenüber der gesunden Kontrolle bei allen untersuchten Parameter, die das Wurzelwachstum charakterisieren.

Die Anwendung der beiden Auxin-Präkursoren führte zu keinen erheblichen Veränderungen beim Wurzelwachstum der Testpflanzen, dennoch konnte eine leichte positive Beeinflussung im Verhältnis zur gestressten Kontrolle beobachtet werden.

Die Abbildung 17 stellt den Einfluss der starken Salzbelastung und die Wirkung der Blattapplikation von TRP und IPyA in den physiologischen Konzentrationen von  $10^{-5}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-10}$  M auf die Wurzelfrischmasse der Tomatensämlinge dar.

Herausragend bei der Blattapplikation dieser Auxin-Präkursoren ist TRP in der Konzentration von  $10^{-5}$  M mit den häufigsten salztoleranzerhöhenden Effekten bei den Testpflanzen.

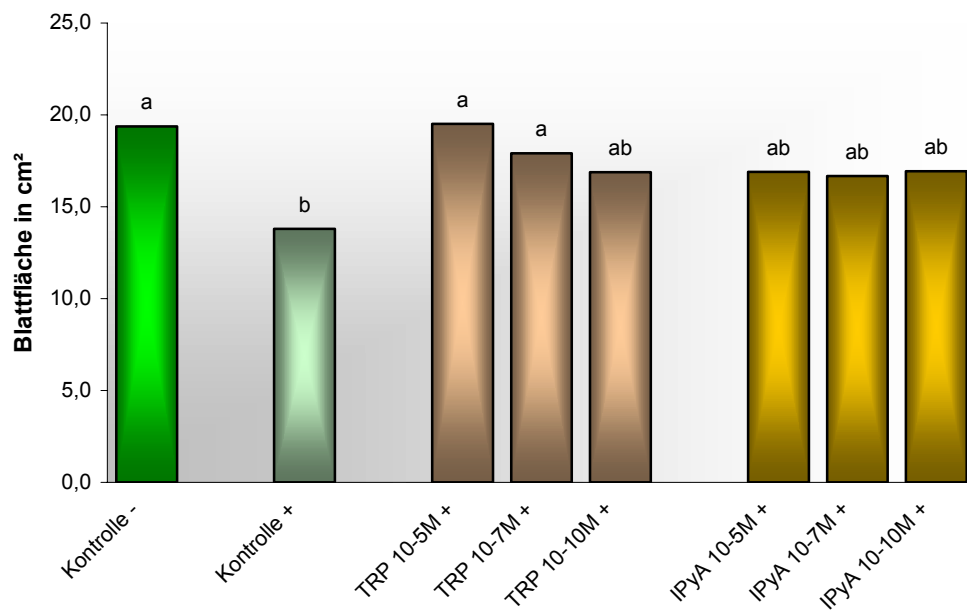


Abb. 16: Wirkung einer Blattapplikation von Tryptophan und Indol-3-pyruvat auf die Blattfläche von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

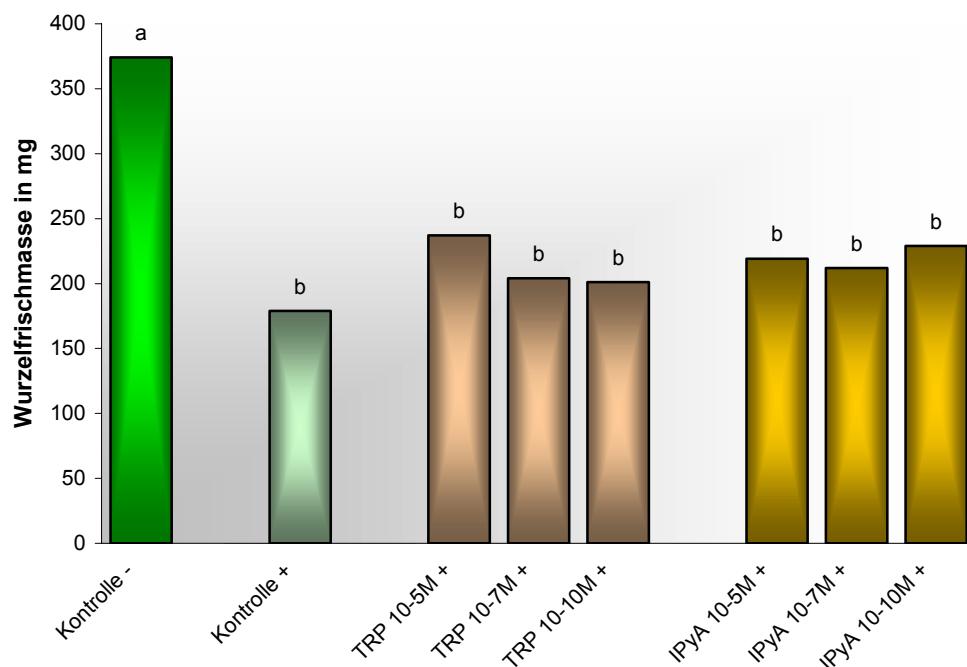


Abb. 17: Wirkung einer Blattapplikation von Tryptophan und Indol-3-pyruvat auf die Wurzelfrischmasse von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Tab. 9: Wirkung einer Blattapplikation von Tryptophan und Indol-3-pyruvat auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test mit p≤0,05, \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SL</sub>=0,79, HSD<sub>SFM</sub>=0,19, HSD<sub>STM</sub>=16,96, HSD<sub>BF</sub>=3,48, HSD<sub>WL</sub>=25,82, HSD<sub>WFM</sub>=60,50)

		Kontrolle -	Kontrolle +	TRP 10 <sup>-5</sup> M +	TRP 10 <sup>-7</sup> M +	TRP 10 <sup>-10</sup> M +	IPyA 10 <sup>-5</sup> M +	IPyA 10 <sup>-7</sup> M +	IPyA 10 <sup>-10</sup> M +
SL	cm	6,8±0,7 a	5,8±0,7 b	6,3±0,5 ab	6,4±0,4 ab	6,2±0,5 ab	6,0±0,6 b	6,2±0,4 ab	6,0±0,6 b
	rel.	100	85	<u>94</u>	<u>94</u>	91	88	91	88
SFM	g	0,74±0,09 b	0,74±0,16 b	1,02±0,11 a	0,99±0,12 a	0,91±0,19 ab	0,96±0,16 a	0,88±0,11 ab	0,89±0,11 ab
	rel.	100	101	<u>139</u>	134	124	130	119	121
STM	mg	87±14 a	64±16 b	82±10 a	77±9 ab	74±13 ab	79±14 ab	76±7 ab	74±8 ab
	rel.	100	74	<u>94</u>	89	85	91	87	85
BF	cm <sup>2</sup>	19,4±2,4 a	13,8±3,3 b	19,5±2,2 a	17,9±2,2 a	16,9±3,4 ab	16,9±2,6 ab	16,7±1,4 ab	16,9±1,8 ab
	rel.	100	71	<u>101</u>	92	87	87	86	87
WL	cm	254,8±11,2 a	125,6±19,7 b	134,0±15,2 b	136,2±10,4 b	133,0±12,2 b	133,6±7,2 b	130,2±8,6 b	147,8±12,0 b
	rel.	100	49	53	53	52	52	51	<u>58</u>
WFM	mg	374±36 a	179±47 b	237±43 b	204±44 b	201±46 b	219±40 b	212±30 b	229±56 b
	rel.	100	48	<u>63</u>	55	54	59	57	61
WTM	mg	20±0 *	10±0	12±4	10±0	10±0	10±0	10±0	11±3
	rel.	100	50	<u>60</u>	50	50	50	50	55

### Blattapplikation von IAAld und IAA

Neben den Auxin-Präkursoren sollte nun auch das Auxin direkt geprüft werden.

Die Tabelle 10 zeigt den Einfluss des hohen Salzstress und die Wirkung einer Blattapplikation von Indol-3-acetaldehyd (IAAld) und Indol-3-essigsäure (IAA) auf das Wachstum der Testpflanzen.

Die Salzapplikation bewirkte eine signifikante Erhöhung der Frischmasse und eine erhebliche Hemmung der Trockenmasse des Sprosses gegenüber der gesunden Kontrolle.

Die Behandlung der Sämlinge mit IAAld und IAA hatte keine statistisch gesicherten Auswirkungen auf das Sprosswachstum, dennoch konnte durch IAAld eine leichte Förderung im Vergleich zur salzgestressten Kontrolle beobachtet werden. Die Anwendung von IAA zeigte keine eindeutige Wirkung in den Konzentrationen von  $10^{-5}$  M und  $10^{-7}$  M und wirkte hemmend in der Konzentration von  $10^{-10}$  M.

Alle Wachstumsparameter der Wurzel wurden im Verhältnis zur gesunden Kontrolle durch die NaCl-Applikation erheblich reduziert.

Durch die Anwendung der Auxine konnte keine signifikante Wirksamkeit ermittelt werden, dennoch bewirkte IAAld eine leichte Stimulierung des Wurzelwachstums. IAA zeigte denselben Trend wie beim Spross.

Betonenswert ist hier IAAld in der Konzentration von  $10^{-5}$  M mit der höchsten Effektivität hinsichtlich einer Toleranzerhöhung gegenüber Salinität bei den Tomatensämlingen, die bei der Sprosstrockenmasse (Abbildung 18) am deutlichsten erkennbar ist.

Auch bei der Blattapplikation ist insgesamt eine Aktivität der Auxin-Präkursoren in der Salztoleranzerhöhung der Pflanzen ersichtlich und weniger des Auxins selbst, womit die Ergebnisse der Wurzelapplikation der Auxine bestätigt werden.

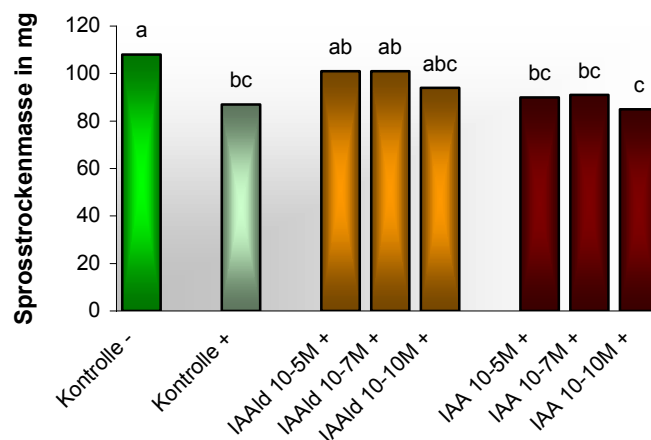


Abb. 18: Wirkung einer Blattapplikation von Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Sprosstrockenmasse von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Tab. 10: Wirkung einer Blattapplikation von Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 7-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WL:Wurzellänge, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, n<sub>WL</sub>=5, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit p≤0,05, \* bedeutet signifikanten Unterschied zur Kontrolle + nach dem Chi-Quadrat-Test mit p≤0,05, HSD<sub>SL</sub>=0,87, HSD<sub>SFM</sub>=0,17, HSD<sub>STM</sub>=15,55, HSD<sub>BF</sub>=3,33, HSD<sub>WL</sub>=50,26)

		Kontrolle -	Kontrolle +	IAAld 10 <sup>-5</sup> M +	IAAld 10 <sup>-7</sup> M +	IAAld 10 <sup>-10</sup> M +	IAA 10 <sup>-5</sup> M +	IAA 10 <sup>-7</sup> M +	IAA 10 <sup>-10</sup> M +
SL	cm	7,6±0,7 a	7,1±0,6 a	7,0±0,4 a	7,1±0,7 a	6,9±0,7 a	7,0±0,6 a	6,9±0,5 a	6,8±0,6 a
	rel.	100	93	93	93	91	93	92	90
SFM	g	0,89±0,10 c	1,13±0,14 ab	1,27±0,10 a	1,23±0,16 ab	1,23±0,10 ab	1,11±0,15 ab	1,17±0,09 ab	1,10±0,13 b
	rel.	100	127	143	138	138	125	132	123
STM	mg	108±11 a	87±9 bc	101±6 ab	101±14 ab	94±10 abc	90±12 bc	91±12 bc	85±12 c
	rel.	100	81	94	94	87	83	84	79
BF	cm <sup>2</sup>	22,1±2,0 a	21,1±2,1 a	23,0±1,9 a	22,3±2,8 a	22,0±2,0 a	20,6±2,3 a	20,5±1,9 a	20,2±3,6 a
	rel.	100	96	104	101	100	93	93	92
WL	cm	350,8±41,5 a	221,0±25,3 b	227,2±18,5 b	228,0±18,0 b	214,8±21,8 b	205,0±18,4 b	208,0±18,4 b	207,6±25,2 b
	rel.	100	63	65	65	61	58	59	59
WFM <sup>1</sup>	mg	479±93 a	308±52 b	330±39 ab	316±65 b	326±44 ab	315±37 b	329±42 ab	284±39 b
	rel.	100	64	69	66	68	66	69	59
WTM	mg	26±7 *	12±4	14±5	15±5	12±4	13±5	14±5	11±3
	rel.	100	46	54	58	46	50	54	42



## 5.5 Sprosskultur mit TRP, IPyA, IAAld und IAA

Da die Aufnahme und stoffwechselmäßige Integration besonders der Auxin-Präkursoren für die Salztoleranzerhöhung sich als bedeutsam erwiesen, interessierte uns, ob auch bei anderen Auxin gesteuerten Wirkungen in der Pflanze wie z. B. die Adventivwurzelbildung sich ein ähnliches Bild abhebt.

Die Wirkung der Auxin-Präkursoren Tryptophan (TRP), Indol-3-pyruvat (IPyA), Indol-3-acetaldehyd (IAAld) und des Auxins (IAA) auf die Adventivwurzelbildung der Segmente bei 0 mM NaCl ist in der Tabelle 11 und bei 150 mM NaCl in der Tabelle 12 dargestellt.

### Bewurzelungsrate

Bei 0 mM NaCl erbrachten IPyA und IAA  $10^{-5}$  M mit einer Bewurzelungsrate von 92 % eine Erhöhung des Parameters um jeweils 60 % gegenüber der Kontrolle (Abbildung 19). Eine starke Hemmung bewirkten dagegen TRP  $10^{-5}$  M und IAAld  $10^{-5}$  M und  $10^{-7}$  M mit einer Abnahme der Bewurzelungsrate um jeweils 20 % im Verhältnis zur Kontrolle.

Die Salzapplikation führte zu einer Abnahme der Bewurzelungsrate der Segmente um 24 %.

Bei 150 mM NaCl zeigte IAA  $10^{-5}$  M eine Stimulierung des Parameters um beachtliche 84 %, während IPyA  $10^{-5}$  M sowie IAA  $10^{-7}$  M eine geringere Wirksamkeit hatten mit einer 40 %- bzw. 24 %-Erhöhung der Bewurzelungsrate im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20). Nennenswert ist auch, dass die Bewurzelungsrate von IAA bei beiden Konzentrationen unverändert blieb trotz der starken Salzbelastung.

Insgesamt ist erkennbar, dass in Abwesenheit von Salz nur IPyA und IAA  $10^{-5}$  M eine Förderung der Bewurzelungsrate bewirkten, während bei 150 mM NaCl IPyA und IAA  $10^{-5}$  M und  $10^{-7}$  M, sowie TRP und IAAld zu einer Stimulierung des Parameters führten.

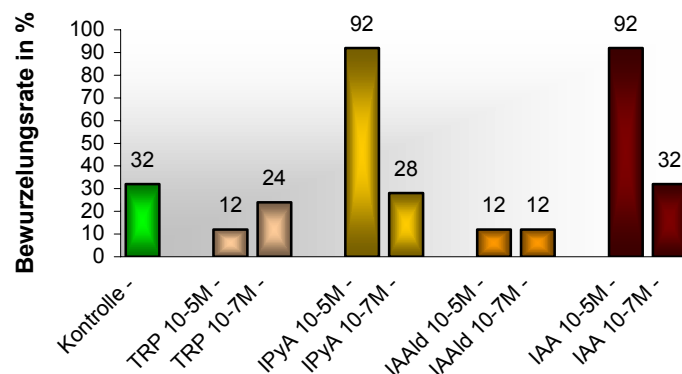


Abb. 19: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Bewurzelungsrate von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 16-tägiger Kulturdauer bei 0 mM NaCl (-:ohne NaCl, jeder Wert repräsentiert die durchschnittliche Bewurzelungsrate von 25 Hypokotylsegmenten)

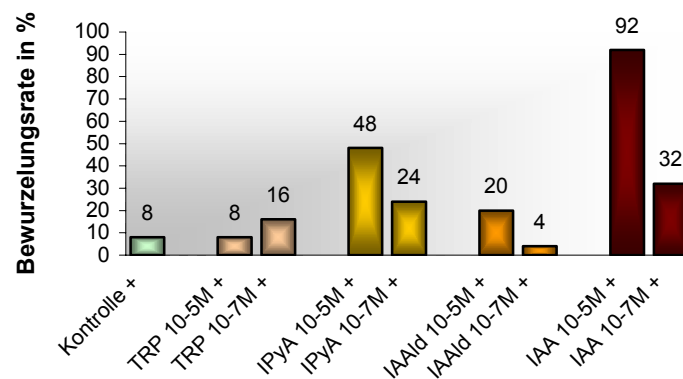


Abb. 20: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Bewurzelungsrate von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 16-tägiger Kulturdauer bei 150 mM NaCl (+:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert die durchschnittliche Bewurzelungsrate von 25 Hypokotylsegmenten)

### Wurzelaanzahl

In Abwesenheit des Stressors hatten IAA und IPyA in der  $10^{-5}$  M-Konzentration einen stark positiven Einfluss auf die Wurzelanzahl der Hypokotylsegmente mit einer Stimulierung des Parameters um 211 % bzw. um 83 % im Verhältnis zur Kontrolle (Abbildung 21). Stark hemmend wirkten dagegen TRP in der  $10^{-5}$  M-Konzentration und IAA in der  $10^{-7}$  M-Konzentration mit einer Reduzierung der Wurzelanzahl um jeweils 52 %, sowie TRP  $10^{-7}$  M und IAAld  $10^{-5}$  M mit einer Hemmung des Parameters um 43 % bzw. 35 % im Vergleich zur Kontrolle.

Die Applikation des Stressfaktors führte zu einer Abnahme der Wurzelanzahl der Segmente von durchschnittlich 4,1 Wurzeln/Segment auf 1,5 Wurzeln/Segment.

Unter dem Einfluss von 150 mM NaCl blieb die positive Wirkung von IAA und IPyA in der  $10^{-5}$  M-Konzentration erhalten mit einer Erhöhung der Wurzelanzahl um beachtliche 413 % bzw. 144 % im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 22). IAA  $10^{-7}$  M und TRP  $10^{-5}$  M förderten auch stark die Wurzelanzahl um 58 % bzw. 33 % gegenüber der Kontrolle. IAAld zeigte in der  $10^{-7}$  M-Konzentration einen negativen Einfluss auf die Wurzelanzahl mit einer Abnahme des Parameters um 33 % gegenüber der Kontrolle.

Ähnlich wie bei der Bewurzelungsrate ist auch bei der Wurzelanzahl der Hypokotylsegmente insgesamt ersichtlich, dass in Abwesenheit des Stressfaktors nur IPyA und IAA in der  $10^{-5}$  M-Konzentration eine Stimulierung der Wurzelanzahl bewirkten, während unter dem Einfluss der hohen Salinität IPyA und IAA in beiden Konzentrationen, sowie auch die anderen Auxin-Präkursoren einen positiven Einfluss auf diesen Parameter hatten.

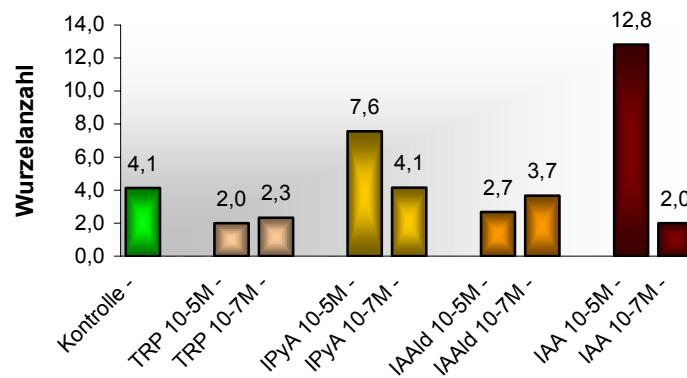


Abb. 21: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzelszahl von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 16-tägiger Kulturdauer bei 0 mM NaCl (-:ohne NaCl, jeder Wert repräsentiert die durchschnittliche Wurzelszahl von 25 Hypokotylsegmenten)

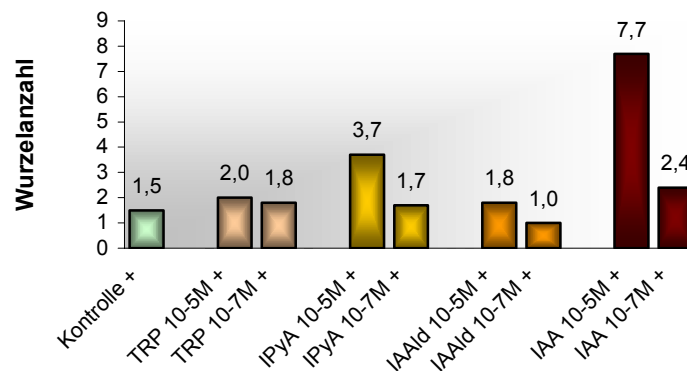


Abb. 22: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzelszahl von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 16-tägiger Kulturdauer bei 150 mM NaCl (+:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert die durchschnittliche Wurzelszahl von 25 Hypokotylsegmenten)

### Durchschnittliche Wurzellänge

Bei 0 mM NaCl förderten alle IAA-Präkursoren in beiden Konzentrationen die Wurzellänge, sowie IAA  $10^{-7}$  M (Abbildung 23). Stärker ausgeprägt war die Wirkung von TRP  $10^{-5}$  M mit einer 258 %- und TRP  $10^{-7}$  M mit einer 142 %-Erhöhung des Parameters im Vergleich zur Kontrolle. IAAld, IPyA und IAA  $10^{-7}$  M stimulierten ebenfalls stark die durchschnittliche Wurzellänge um 99 %, 94 % und 90 % gegenüber der Kontrolle.

Die Salzapplikation führte zu einer Erhöhung der Wurzellänge von 15 mm/Wurzel auf 39,3 mm/Wurzel.

Bei 150 mM NaCl bewirkten alle IAA-Präkursoren sowie IAA in beiden Konzentrationen eine Abnahme der Wurzellänge. Weniger ausgeprägt war die negative Wirkung von IAAld  $10^{-5}$  M mit einer 9 %- und IPyA  $10^{-7}$  M mit einer 62 %-Reduzierung des Parameters im Verhältnis zur

Kontrolle (Abbildung 24).

In Abwesenheit von Salzstress bewirkten insgesamt alle Auxin-Präkursoren in beiden Konzentrationen eine Stimulierung der durchschnittlichen Wurzellänge, sowie IAA  $10^{-7}$  M. In Anwesenheit von Salzstress dagegen führten alle Substanzen eine Hemmung der durchschnittlichen Länge der Wurzeln herbei.

Die erzielten Befunde unterstreichen: Auch an Sprosssegmenten der Testpflanze zeigte sich eine Aufnahme der applizierten Wirkstoffe und eine Aktivität in der Adventivwurzelsbildung. Hinsichtlich der Bewurzelungsrate und der Wurzelanzahl waren gleichermaßen auffällig IPyA und IAA  $10^{-5}$  M, in der Stimulierung der Wurzellänge dominierten TRP  $10^{-5}$  M und  $10^{-7}$  M. Unter gleichzeitigem Salzangebot zeigte in der Kompensation des Salzschadens bei der Bewurzelungsrate und der Wurzelanzahl eindeutig IAA  $10^{-5}$  M die höchste Effektivität, sowie IPyA  $10^{-5}$  M. Hinsichtlich der Wurzellänge hatten jedoch IAAlD  $10^{-5}$  M und IPyA  $10^{-7}$  M die beste Wirkung.

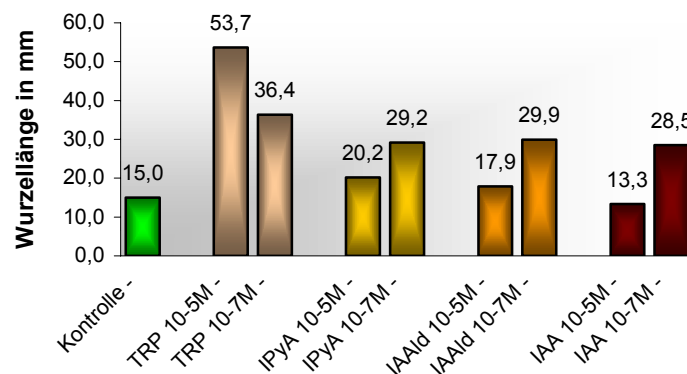


Abb. 23: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzellänge von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 16-tägiger Kulturdauer bei 0 mM NaCl (-:ohne NaCl, jeder Wert repräsentiert die durchschnittliche Wurzellänge von 25 Hypokotylsegmenten)

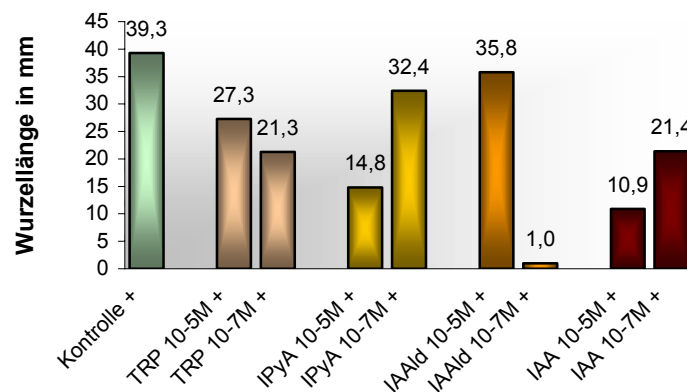


Abb. 24: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzellänge von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 16-tägiger Kulturdauer bei 150 mM NaCl (+:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert die durchschnittliche Wurzellänge von 25 Hypokotylsegmenten)

Tab. 11: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Bewurzelungsrate, die Wurzelanzahl und die Wurzellänge von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 16-tägiger Kulturdauer bei 0 mM NaCl (-:ohne NaCl, jeder Wert repräsentiert die durchschnittliche Bewurzelungsrate, Wurzelanzahl oder Wurzellänge von 25 Hypokotylsegmenten)

		Kontrolle -	TRP 10 <sup>-5</sup> M -	TRP 10 <sup>-7</sup> M -	IPyA 10 <sup>-5</sup> M -	IPyA 10 <sup>-7</sup> M -	IAAld 10 <sup>-5</sup> M -	IAAld 10 <sup>-7</sup> M -	IAA 10 <sup>-5</sup> M -	IAA 10 <sup>-7</sup> M -
Anzahl der eingesetzten Segmente		25	25	25	25	25	25	25	25	25
Anzahl der bewurzelten Segmente		8	3	6	23	7	3	3	23	8
Anzahl der gebildeten Wurzeln		33	6	14	174	29	8	11	295	16
Summe der Wurzellängen (mm)		495	322	509	3515	846	143	329	3929	456
Bewurzelungsrate (%)		32	12	24	<u>92</u>	28	12	12	<u>92</u>	32
Wurzelanzahl	abs.	4,1	2,0	2,3	7,6	4,1	2,7	3,7	12,8	2,0
	rel.	100	48	57	<u>183</u>	100	65	89	<u>311</u>	48
Wurzellänge	mm	15,0	53,7	36,4	20,2	29,2	17,9	29,9	13,3	28,5
	rel.	100	<u>358</u>	<u>242</u>	135	194	119	199	89	190

Tab. 12: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Bewurzelungsrate, die Wurzelanzahl und die Wurzellänge von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 16-tägiger Kulturdauer bei 150 mM NaCl (+:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert die durchschnittliche Bewurzelungsrate, Wurzelanzahl oder Wurzellänge von 25 Hypokotylsegmenten)

		Kontrolle +	TRP 10 <sup>-5</sup> M +	TRP 10 <sup>-7</sup> M +	IPyA 10 <sup>-5</sup> M +	IPyA 10 <sup>-7</sup> M +	IAAld 10 <sup>-5</sup> M +	IAAld 10 <sup>-7</sup> M +	IAA 10 <sup>-5</sup> M +	IAA 10 <sup>-7</sup> M +
Anzahl der eingesetzten Segmente		25	25	25	25	25	25	25	25	25
Anzahl der bewurzelten Segmente		2	2	4	12	6	5	1	23	8
Anzahl der gebildeten Wurzeln		3	4	7	44	10	9	1	177	19
Summe der Wurzellängen (mm)		118	109	149	649	324	322	1	1929	407
Bewurzelungsrate (%)		8	8	16	<u>48</u>	24	20	4	<u>92</u>	32
Wurzelanzahl	abs.	1,5	2,0	1,8	3,7	1,7	1,8	1,0	7,7	2,4
	rel.	100	133	117	<u>244</u>	111	120	67	<u>513</u>	158
Wurzellänge	mm	39,3	27,3	21,3	14,8	32,4	35,8	1,0	10,9	21,4
	rel.	100	69	54	38	<u>82</u>	<u>91</u>	3	28	54

## 5.6 Sprosskultur mit IPyA und IAA

Interessant erscheint im weiteren zu prüfen, ob und inwieweit ein zusätzliches Angebot sowohl eines Auxin-Präkursors (Indol-3-pyruvat, IPyA), als auch Auxins (IAA) zur Aufnahme durch Gewebe der Testpflanze bei einer Sprosskultur und zu einer Anreicherung bzw. Gehaltsänderung dort selbst führt, und zwar unter normalen und salzgestressten Wachstumsbedingungen.

Im Verlauf der Zeit wurde eine Abnahme des natürlichen IAA-Gehaltes der Segmente beobachtet und die Salinität führte zu einer weiteren Hemmung während der Kultivierung. Nach 2, 4 und 6 d Kulturdauer wurde durch die Salzbelastung eine Abnahme des IAA-Gehaltes um 0,25, 0,04 und 0,16 nmol/g Trockenmasse festgestellt.

Bei 0 mM NaCl betrug der endogene IAA-Gehalt der Segmente 2 d nach Beginn der Kultur 2,04 nmol/g Trockenmasse (Abbildung 25). 4 bzw. 6 d nach Beginn der Kultur nahm der IAA-Gehalt ab um 0,66 bzw. 0,43 nmol/g Trockenmasse. Bei Applikation von IPyA  $10^{-5}$  M blieb der IAA-Gehalt nach 2 und 4 d Kultur unverändert. Nach 6 d Kultivierung förderte jedoch IPyA  $10^{-5}$  M den IAA-Gehalt der Segmente um 0,12 nmol/g Trockenmasse gegenüber der Kontrolle. Zugabe von exogenem IAA  $10^{-5}$  M zeigte eine frühere und stärkere Wirksamkeit mit einer Förderung des IAA-Gehaltes um 0,1, 0,05 und 0,53 nmol/g Trockenmasse im Verhältnis zur Kontrolle nach 2, 4 und 6 d Kultur.

In Anwesenheit des Stressfaktors betrug der endogene IAA-Gehalt der Segmente 2 d nach Beginn der Kultivierung 1,79 nmol/g Trockenmasse (Abbildung 26). 4 bzw. 6 d nach Beginn der Kultur nahm der IAA-Gehalt um 0,45 bzw. 0,55 nmol/g Trockenmasse ab. Zufuhr von IPyA  $10^{-5}$  M wirkte sich positiv auf den IAA-Gehalt der Segmente aus mit einer Erhöhung um 0,07 bzw. 0,12 nmol/g Trockenmasse im Vergleich zur Kontrolle nach 2 bzw. 6 d Kulturdauer. Nach 4 d Kultivierung wirkte sich IPyA  $10^{-5}$  M dagegen negativ auf den IAA-Gehalt aus mit einer Abnahme um 0,04 nmol/g Trockenmasse gegenüber der Kontrolle. Zugabe von IAA  $10^{-5}$  M förderte konstant den IAA-Gehalt der Segmente mit einer Erhöhung um 0,25, 0,14 und 0,34 nmol/g Trockenmasse im Verhältnis zur Kontrolle nach 2, 4 und 6 d Kulturdauer.

Insgesamt führte die exogene Applikation von IPyA und IAA  $10^{-5}$  M zu einer Erhöhung des IAA-Gehaltes, auch bei einer Exposition der Sprosssegmente gegenüber hoher Salinität, die den endogenen IAA-Gehalt vermindert. Außerdem zeigt die Dynamik des IAA-Gehaltes der Segmente eine zeitliche Verlagerung der positiven Wirkung der zugeführten IPyA und IAA nach Exposition zu NaCl-Stress.

Die Untersuchungsbefunde belegen, dass mit exogener Auxin- bzw. Auxin-Präkursoren-Zufuhr der endogene IAA-Gehalt pflanzlichen Gewebes erhöht wird, auch und insbesondere

unter dem Stresseinfluss von Salz. Damit ist eine Introduktion von zugeführtem Auxin in das salzgestresste Pflanzengewebe mit einem „Eingriff“ in das Stoffwechselgeschehen als realistisch zu bewerten. Wenngleich allerdings bei allen Pflanzenversuchen von den applizierten Auxin-Präkursoren eine deutliche Einwirkung auf die pflanzliche Toleranz gegenüber Salzstressung ausging, dominiert in den vorliegenden Modellversuchen nur mit Sprossgewebe in der Aufnahme und Introduktion die IAA.

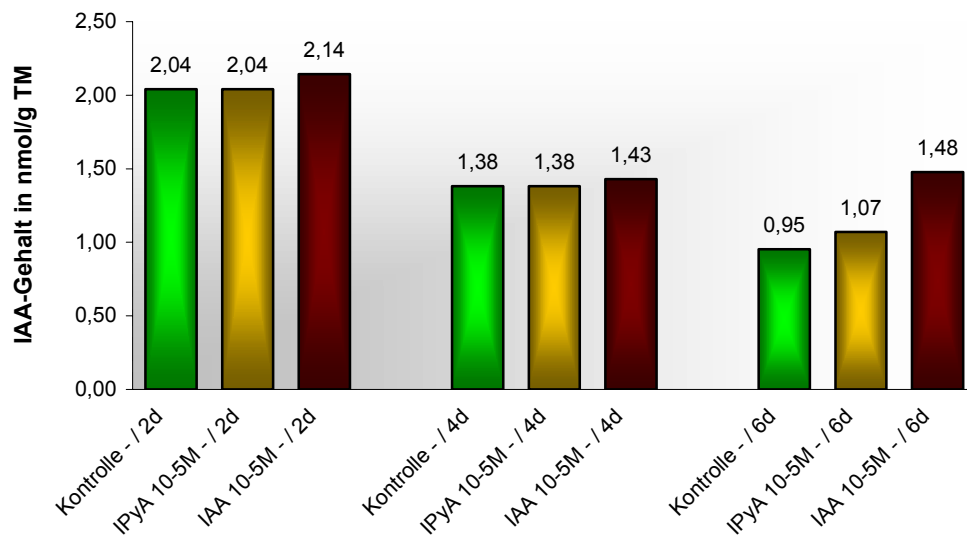


Abb. 25: Wirkung von Indol-3-pyruvat und Indol-3-essigsäure auf den Indol-3-essigsäure-Gehalt von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 2-, 4- und 6-tägiger Kulturdauer bei 0 mM NaCl (-: ohne NaCl, jeder Wert repräsentiert den durchschnittlichen Indol-3-essigsäure-Gehalt von 15 Hypokotylsegmenten)

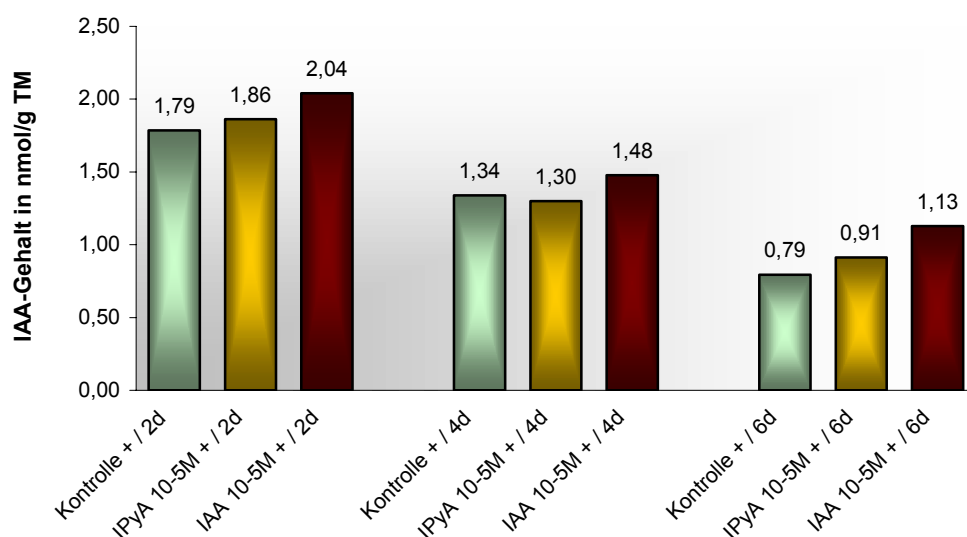


Abb. 26: Wirkung von Indol-3-pyruvat und Indol-3-essigsäure auf den Indol-3-essigsäure-Gehalt von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach 2-, 4- und 6-tägiger Kulturdauer bei 150 mM NaCl (+: mit NaCl, jeder Wert repräsentiert den durchschnittlichen Indol-3-essigsäure-Gehalt von 15 Hypokotylsegmenten)



## 5.7 Gewächshauskultur

Aus den bisherigen Modellversuchen lässt sich ableiten, dass Auxin-Präkursoren bzw. Auxin als Stoffwechselprodukte von *B. subtilis*, von der Pflanze aufgenommen werden - vorzugsweise offenbar die Auxin-Präkursoren - und über eine Integration in den pflanzlichen Hormonhaushalt eine positive Rolle bei der Toleranzerhöhung der Pflanzen gegenüber Salzstress einnehmen. Es interessierte uns, ob dieses Phänomen auch bei erwachsenen Pflanzen an natürlichen *in vivo* Pflanzensystemen eintritt. Zur Beantwortung der Frage führten wir den Gewächshausversuch.

Die Tabelle 13 zeigt den Einfluss der Salinität in Höhe von 100 mM NaCl, und die Wirkung der Auxin-Präkursoren Tryptophan (TRP), Indol-3-pyruvat (IPyA) und Indol-3-acetaldehyd (IAAld) und des Auxins (IAA) in den Konzentrationen von  $10^{-5}$  M und  $10^{-10}$  M auf das Wachstum der Testpflanzen.

Die Salzeinführung hatte eine negative, statistisch nicht gesicherte Auswirkung auf das Sprosswachstum der Pflanzen, mit Ausnahme die Blattfläche, die dadurch signifikant gehemmt wurde gegenüber der gesunden Kontrolle.

Durch die Behandlung der Pflanzen mit den Auxinen konnten keine erhebliche Wirksamkeiten verzeichnet werden. Lediglich die Anwendung von TRP  $10^{-5}$  M führte zu einer signifikanten Hemmung der Länge um 15 % im Verhältnis zur NaCl-Kontrolle. Erwähnenswert ist, dass die Behandlung der Pflanzen mit IPyA  $10^{-5}$  M und  $10^{-10}$  M die Blattfläche der Pflanzen leicht förderte, um 14 % und 17 % im Vergleich zur salzgestressten Kontrolle (Abbildung 29). Die Applikation von IAAld in den Konzentrationen von  $10^{-5}$  M und  $10^{-10}$  M bewirkte ebenfalls eine leichte Stimulierung der Blattfläche gegenüber der gestressten Kontrolle um jeweils 9 %. Insgesamt führte die Anwendung von IPyA, insbesondere bei der  $10^{-5}$  M-Konzentration, zu einer positiven Beeinflussung des Sprosswachstums, während die Applikation von TRP, IAAld und IAA einen negativen Einfluss zeigte.

Die Introduktion des Stressfaktors bewirkte eine leichte, nicht signifikante Hemmung der Frischmasse und der Trockenmasse der Wurzel gegenüber der gesunden Kontrolle.

Die Anwendung der Auxine führte beim Wurzelwachstum ebenfalls zu keinen erheblichen Unterschieden. Dennoch konnte durch die Behandlung der Pflanzen mit IPyA  $10^{-5}$  M eine leichte Förderung der Trockenmasse um 15 % im Vergleich zur salzgestressten Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 30). Die Frischmasse der mit IPyA  $10^{-5}$  M behandelten Pflanzen war ebenfalls um 15 % höher als der entsprechende Parameter bei den Kontrollpflanzen. Insgesamt bewirkten IPyA und IAA  $10^{-5}$  M eine leichte Stimulierung des Wurzelwachstums, während diese Substanzen in der Konzentration von  $10^{-10}$  M sowie TRP und IAAld hemmend wirkten.



Abb. 27: Gewächshausversuch

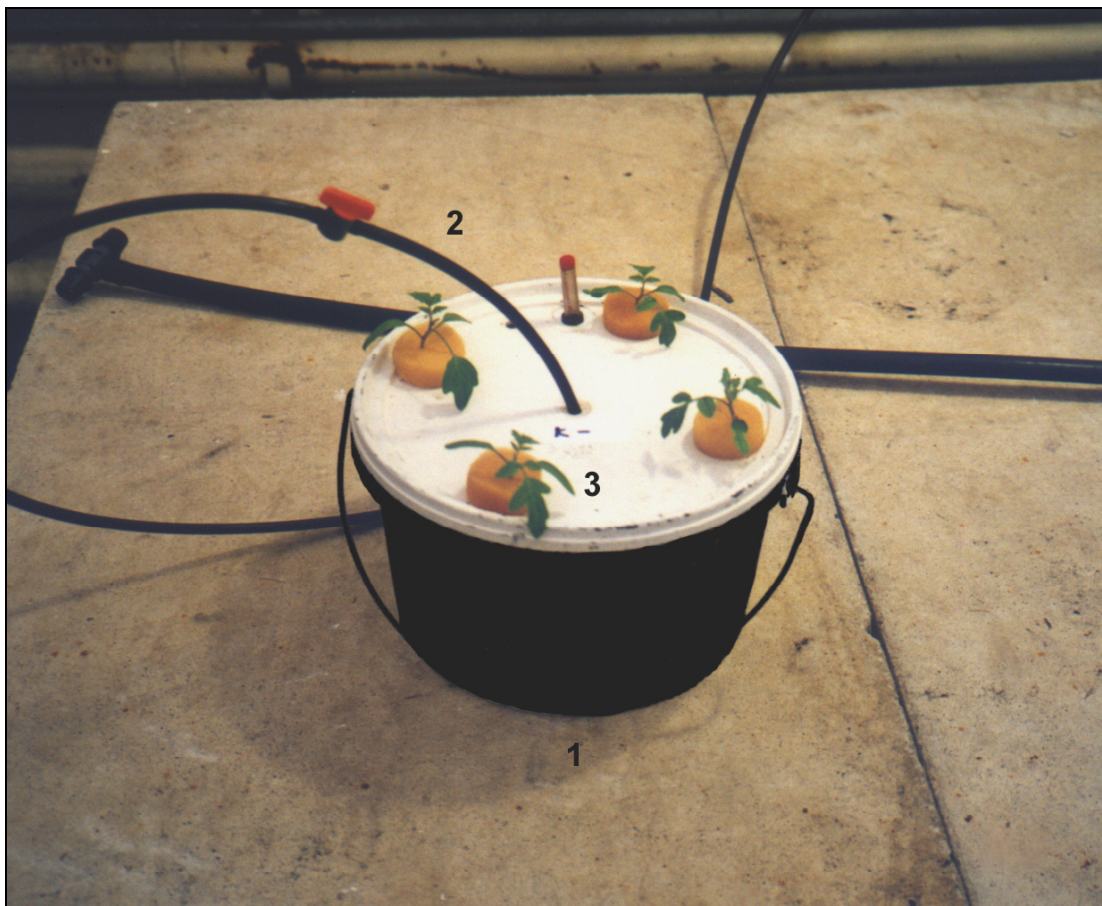


Abb. 28: Versuchsanstellung im Gewächshaus  
(1 = Plastiktopf mit Deckel, 2 = Kapillarschlauch, 3 = Schaumstoffstückchen)

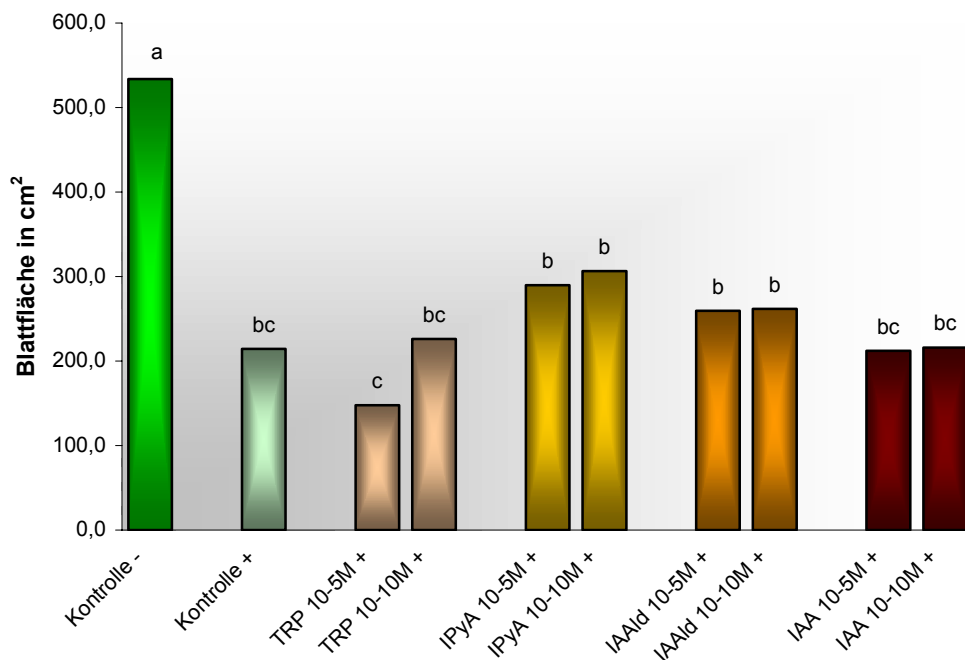


Abb. 29: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Blattfläche von Tomatensämlingen nach 6-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 100 mM NaCl und insgesamt 27-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

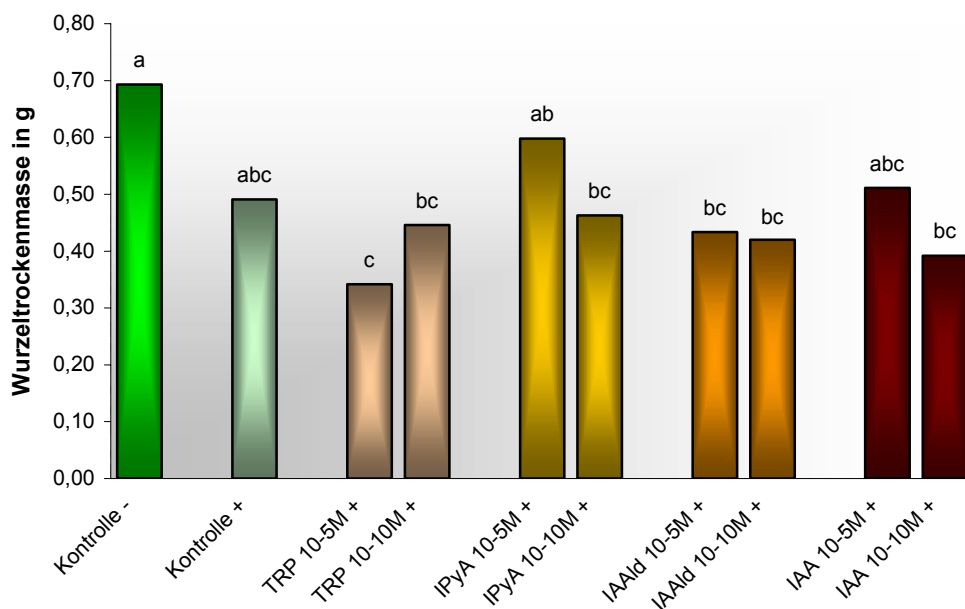


Abb. 30: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzeltrockenmasse von Tomatensämlingen nach 6-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 100 mM NaCl und insgesamt 27-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, n=10, verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach dem Tukey-Test mit  $p \leq 0,05$ )

Die Salzapplikation führte zu einer Abnahme des Wassergehaltes im Spross der Testpflanzen um 0,7 % im Verhältnis zur gesunden Kontrolle.

Die Behandlung der Pflanzen mit IPyA  $10^{-5}$  M und  $10^{-10}$  M bewirkte eine Erhöhung des Wassergehaltes um 0,5 % bzw. 0,6 % gegenüber der salzgestressten Kontrolle (Abbildung 31). Die Anwendung von IAAld und IAA  $10^{-10}$  M führte ebenfalls zu einer Förderung des Parameters um jeweils 0,2 % im Vergleich zur NaCl-Kontrolle. Die Anwendung von TRP und IAAld  $10^{-10}$  M hatte keinen Einfluss auf den Wassergehalt des Sprosses. Einen negativen Einfluss zeigten IAA  $10^{-10}$  M und TRP  $10^{-5}$  M mit einer Hemmung des Wassergehaltes um 0,2 % bzw. 0,4 % im Verhältnis zur gestressten Kontrolle. Insgesamt zeigte die Behandlung der Pflanzen mit IPyA in beiden Konzentrationen, sowie die Behandlung mit IAAld und IAA einen positiven Einfluss auf den Wassergehalt des Sprosses.

Die Introduktion von NaCl bewirkte eine Abnahme des Wassergehaltes in der Wurzel der Pflanzen um 0,3 % gegenüber der gesunden Kontrolle.

Die Anwendung von IPyA und IAA  $10^{-10}$  M führte zu einer Förderung des Wassergehaltes der Wurzel um jeweils 0,5 % im Vergleich zur salzgestressten Kontrolle (Abbildung 32). Die Behandlung der Sämlinge mit IAAld  $10^{-10}$  M und IPyA  $10^{-5}$  M bewirkte ebenfalls eine Stimulierung des Parameters um 0,4 % bzw. 0,1 % im Verhältnis zur NaCl-Kontrolle. Die Anwendung von TRP  $10^{-10}$  M und IAA  $10^{-5}$  M zeigte keinen Einfluss und die Applikation von TRP und IAAld  $10^{-10}$  einen negativen Einfluss auf den Wassergehalt der Wurzel mit einer Hemmung des Parameters um 0,5 % gegenüber der gestressten Kontrolle. Ähnlich wie beim Spross, ist auch bei der Wurzel insgesamt eine Förderung des Wassergehaltes durch die Behandlung der Pflanzen mit IPyA in beiden Konzentrationen, sowie durch die Behandlung mit IAAld und IAA ersichtlich.

Wenngleich nur in begrenzten Umfang, gibt auch der *in vivo* Gewächshausversuch aus der Gesamtermittlung aller Modellversuche, dass eine mit 6 Tagen Jungpflanzenbehandlung der Tomate mit dem Auxin-Präkursor IPyA die Pflanzen befähigte, während einer nachfolgenden 3-wöchigen Versuchsdauer unter erheblichem Salzstress, ein besseres Wachstum als die entsprechende Kontrolle zu realisieren (hervorgehobene Relativwerte in Tabelle 13). Übereinstimmend beeindruckt, dass der für einen hohen Salzstress typische Wasserverlust der Pflanzen ebenfalls durch eine 6-tägige Vorbehandlung der Pflanzen mit dem Auxin-Präkursor IPyA (und z. T. auch IAA in der Wurzel) deutlich reduziert wird und einer Salzstress-Toleranzerhöhung gleichkommt. Gründe hierfür ließen sich auch durch die Beobachtung in den Modellversuchen im Gewächshausversuch machen.

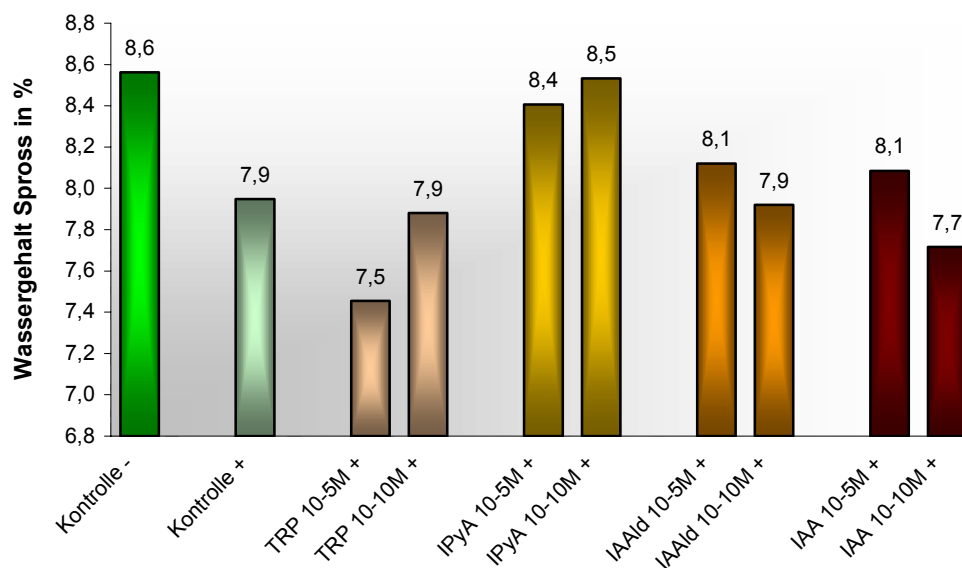


Abb. 31: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt des Sprosses von Tomatensämlingen nach 6-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 100 mM NaCl und insgesamt 27-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert den durchschnittlichen Wassergehalt von 10 Pflanzen)

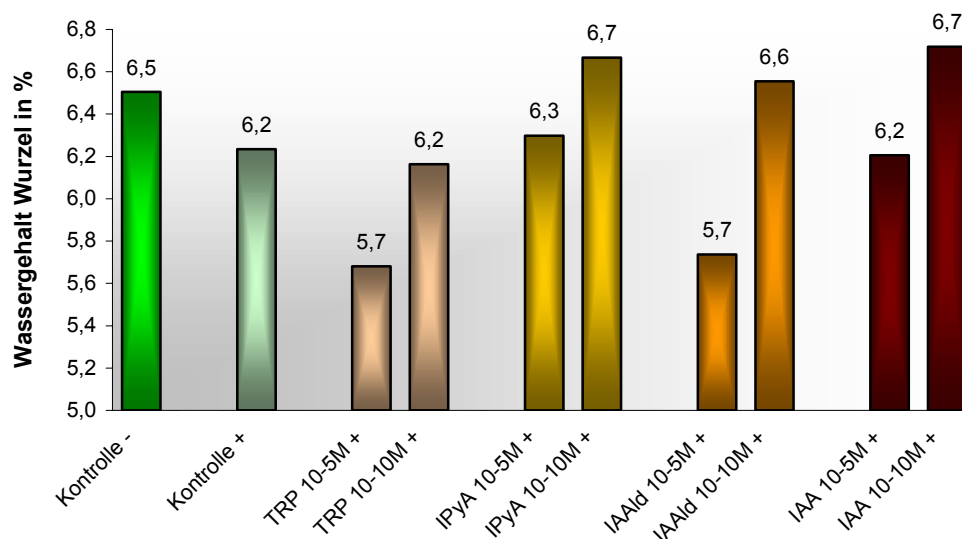


Abb. 32: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt der Wurzel von Tomatensämlingen nach 6-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 100 mM NaCl und insgesamt 27-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, jeder Wert repräsentiert den durchschnittlichen Wassergehalt von 10 Pflanzen)

Tab. 13: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 6-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 100 mM NaCl und insgesamt 27-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit  $p \leq 0,05$ ,  $HSD_{BF}=103,09$ ,  $HSD_{WFM}=4,62$ ,  $HSD_{WTM}=0,22$ )

		Kontrolle -	Kontrolle +	TRP $10^{-5}$ M +	TRP $10^{-10}$ M +	IPyA $10^{-5}$ M +
SL <sup>1</sup>	cm	25,4 ± 4,1      a	15,2 ± 2,1      ab	11,4 ± 2,2      c	11,8 ± 2,2      bc	14,4 ± 2,4      abc
	rel.	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>45</b>	<b>47</b>	<b>57</b>
SFM <sup>1</sup>	g	51,66 ± 12,95      a	25,65 ± 3,35      ab	18,04 ± 5,84      b	20,23 ± 6,26      b	26,15 ± 6,58      ab
	rel.	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>35</b>	<b>39</b>	<b>51</b>
STM <sup>1</sup>	g	4,42 ± 1,15      a	2,04 ± 0,33      abc	1,35 ± 0,46      c	1,59 ± 0,50      bc	2,20 ± 0,56      ab
	rel.	<b>100</b>	<b>46</b>	<b>30</b>	<b>36</b>	<b>50</b>
BF	cm <sup>2</sup>	533,9 ± 115,6      a	214,5 ± 33,9      bc	147,9 ± 60,9      c	226,3 ± 79,0      bc	289,9 ± 74,4      b
	rel.	<b>100</b>	<b>40</b>	<b>28</b>	<b>42</b>	<b>54</b>
WFM	g	10,65 ± 2,61      a	7,88 ± 2,16      ab	6,02 ± 2,22      ab	7,24 ± 2,58      ab	9,50 ± 1,01      ab
	rel.	<b>100</b>	<b>74</b>	<b>57</b>	<b>68</b>	<b>89</b>
WTM	g	0,69 ± 0,12      a	0,49 ± 0,06      abc	0,34 ± 0,07      c	0,45 ± 0,15      bc	0,60 ± 0,06      ab
	rel.	<b>100</b>	<b>71</b>	<b>49</b>	<b>64</b>	<b>86</b>

Fortsetzung Tab. 13: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf das Wachstum von Tomatensämlingen nach 6-tägiger Behandlung, nachfolgendes Wachstum der Pflanzen bei 100 mM NaCl und insgesamt 27-tägiger Kulturdauer (-:ohne NaCl, +:mit NaCl, SL:Sprosslänge, SFM:Sprossfrischmasse, STM:Sprosstrockenmasse, BF:Blattfläche, WFM:Wurzelfrischmasse, WTM:Wurzeltrockenmasse, n=10, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach dem Tukey-Test oder <sup>1</sup> nach dem Kruskal-Wallis-Test mit  $p \leq 0,05$ ,  $HSD_{BF}=103,09$ ,  $HSD_{WFM}=4,62$ ,  $HSD_{WTM}=0,22$ )

		IPyA $10^{-10}$ M +	IAAld $10^{-5}$ M +	IAAld $10^{-10}$ M +	IAA $10^{-5}$ M +	IAA $10^{-10}$ M +
SL <sup>1</sup>	cm	14,6 ± 1,4 ab	12,6 ± 1,1 bc	13,3 ± 1,5 bc	12,9 ± 1,1 bc	13,6 ± 2,1 bc
	rel.	<b>58</b>	<b>50</b>	<b>53</b>	<b>51</b>	<b>53</b>
SFM <sup>1</sup>	g	25,60 ± 4,00 ab	21,59 ± 4,69 b	21,18 ± 4,28 b	23,96 ± 3,04 b	20,54 ± 6,66 b
	rel.	<b>50</b>	<b>42</b>	<b>41</b>	<b>46</b>	<b>40</b>
STM <sup>1</sup>	g	2,18 ± 0,40 ab	1,75 ± 0,38 bc	1,68 ± 0,35 bc	1,94 ± 0,25 bc	1,59 ± 0,56 bc
	rel.	<b>49</b>	<b>40</b>	<b>38</b>	<b>44</b>	<b>36</b>
BF	cm <sup>2</sup>	306,6 ± 55,1 b	259,4 ± 60,2 b	261,8 ± 64,1 b	212,1 ± 35,7 bc	215,8 ± 91,8 bc
	rel.	<b>57</b>	<b>49</b>	<b>49</b>	<b>40</b>	<b>40</b>
WFM	g	6,94 ± 0,99 ab	7,56 ± 0,65 ab	6,41 ± 1,84 ab	8,24 ± 0,28 ab	5,84 ± 1,75 b
	rel.	<b>65</b>	<b>71</b>	<b>60</b>	<b>77</b>	<b>55</b>
WTM	g	0,46 ± 0,02 bc	0,43 ± 0,04 bc	0,42 ± 0,10 bc	0,51 ± 0,03 abc	0,39 ± 0,10 bc
	rel.	<b>67</b>	<b>63</b>	<b>61</b>	<b>74</b>	<b>57</b>

## 6 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die getesteten Stoffwechselprodukte der *Bacillus subtilis*-Stämme FZB24 und FZB41 eine Erhöhung der Salztoleranz bei der Testpflanze Tomate herbeiführen können unter dem Einfluss einer starken Salzbelastung. Allerdings war die positive Wirkung der getesteten Gruppen der Stoffwechselprodukte Kulturfiltrat, Fraktionen der Kulturfiltrate, Peptidextrakt und Auxine auf die pflanzliche Toleranz gegenüber hoher Salinität sehr differenziert und unterschiedlich stark ausgeprägt.

Die aber zweifellos vorhandene Wirkung dieser Stoffwechselprodukte von *B. subtilis* kann einerseits auf einen direkten Einfluss dieser Substanzen auf das Entstehen von Salzschäden, andererseits auf einen indirekten Einfluss auf den pflanzlichen Metabolismus beruhen, z. B. durch Auslösen oder Fördern von Resistenz- bzw. Toleranzmechanismen.

### 6.1 Wirkung des Kulturfiltrats

Das getestete Kulturfiltrat aus der fermentativen Übergangsphase des Stammes FZB24 hatte eine erkennbare, konzentrationsabhängige Wirkung, da es bei der Anwendung der 0,1 %-Konzentration tendenziell eine leichte Wachstumsförderung und der 1 %-Konzentration eine leichte Wachstumshemmung, sowohl im Spross als auch in der Wurzel der Sämlinge unter dem Einfluss von 150 mM NaCl bewirkte.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von DOLEJ (1998). Er beobachtete bei Tomatensämlingen, die ebenfalls mit der 0,1 %-Konzentration des Kulturfiltrats aus der Übergangsphase des Stammes FZB24 kultiviert wurden, allerdings in Abwesenheit eines Stressfaktors, eine leichte Wachstumsstimulierung des Sprosses und der Wurzel. Die Anwendung der 1 %-Konzentration bewirkte dagegen eine leichte Wachstumsdepression im Spross und in der Wurzel der Pflanzen. Eine ähnliche, ebenfalls konzentrationsabhängige Wirkung hatte auch das Kulturfiltrat aus der Übergangsphase des Stammes FZB14 auf das Wachstum der Sämlinge. Allerdings induzierten hier die beiden Kulturfiltrate eine erhebliche Toleranzerhöhung gegenüber dem biotischen Stressfaktor *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, da sie einen deutlich verzögerten Pathogeneseablauf zeigten, insbesondere bei der 0,1 %-Konzentration. GUPTA et al. (2000) belegen eine erhebliche Förderung des Wurzelwachstums von Tomatensämlingen durch Anwendung des Kulturfiltrats aus der Übergangsphase des Stammes FZB14 in 0,1 %-Konzentration, während die Anwendung der 1 %-Konzentration das Wurzelwachstum negativ beeinflusste. Und auch hier konnte durch die Anwendung dieses Kulturfiltrats in 0,1 %- und insbesondere in 1 %-Konzentration eine signifikante Resistenz- oder



Toleranzerhöhung gegenüber *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* induziert werden. Die Ergebnisse von ALEMAYEHU (1997) bei Tomatenkalluskulturen zeigen ebenfalls eine höhere Wirksamkeit der 0,1 %-Konzentration des Kulturfiltrats aus der Übergangsphase des Stammes FZB14, im Vergleich zu der 1 %-Konzentration, hinsichtlich der Wachstumsförderung. Hier induzierte die 0,1 %-Konzentration des Kulturfiltrats, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, eine nur leichte Toleranzerhöhung gegenüber dem Stressor, in diesem Fall dem unspezifischen Toxin Fusarinsäure, das auch von *Fusarium* spp. produziert wird.

Nach DOLEJ (1998) können die Lipopeptide, die von *B. subtilis* produziert werden, mit ansteigender Konzentration eine toxische Wirkung auf das pflanzliche Wachstum ausüben und zu Überlagerungseffekten mit anderen Metaboliten führen. Zu derselben Schlussfolgerung führen auch die Ergebnisse von ALEMAYEHU (1997), der eine negative Beeinflussung der Auxin- und Cytokininaktivität bei komplexen Kulturfiltraten mit zunehmender Kulturdauer beobachtet hat. Deshalb könnte die höhere Effektivität der 0,1 %-Konzentration des getesteten Kulturfiltrats hinsichtlich der wachstumsfördernden und toleranzerhöhenden Wirkung, im Vergleich zu der 1 %-Konzentration, auf eine niedrigere Konzentration der ungünstig wirkenden Lipopeptide zurückgeführt werden.

Bei den Untersuchungen von STEINER et al. (1988) führte die Behandlung von Wintergerste mit B 50, einem proteinreichen Kulturfiltrat aus *B. subtilis*, zu einer Resistenzinduktion gegenüber *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* unter erheblicher Verminderung der Kleistothezienbildung des Pathogens. Die Resistenzinduktion erwies sich als sortenspezifisch, aber unabhängig von der Anfälligkeit und dem Ertragspotential der Pflanzen. Es wird, zumindest teilweise, auf eine verzögerte Blattseneszenz zurückgeführt. OERKE et al. (1989) konnten durch die Anwendung desselben Kulturfiltrats eine Resistenzinduktion bei Winter- und Sommergerste gegenüber *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* erreichen. Eine häufigere Applikation des Kulturfiltrats hatte keinen Einfluss auf die Resistenzinduktion und eine verzögerte Reifung wird mit der höheren Ertragsbildung der induziert resistenten Pflanzen in Verbindung gebracht. Auch KRASKA und SCHÖNBECK (1993) erzielten eine Resistenzinduktion bei Gerste gegenüber *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* durch die Behandlung der Pflanzen mit B 50. Bei den induziert resistenten Pflanzen konnte keine Wachstumsförderung festgestellt werden, aber ein um 11,5 % verminderter DNA-Methylierungsgrad im Vergleich zur Kontrolle, der möglicherweise mit der Resistenzinduktion in Zusammenhang steht. Die Behandlung von Wintergerste mit B 50 bewirkte auch bei den Untersuchungen von KEHLENBECK et al. (1994) eine Resistenzinduktion gegenüber *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* unter erheblicher Erhöhung des Kornertrags und des Stärkegehaltes der Körner. Die erhöhte Toleranz beruht

wahrscheinlich auf eine höhere Assimilationsrate der induziert resistenten Pflanzen und eine verzögerte Abnahme der Aktivität der assimilierenden Blattfläche. KEHLENBECK und SCHÖNBECK (1995) konnten ebenfalls durch die Anwendung von B 50 bei Wintergerste eine Resistenzerhöhung gegenüber *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* hebeiführen. Die Resistenzinduktion führte auch hier zu signifikanter Förderung des Kornertrags und des Stärkegehaltes der Körner. Die Fahnenblätter der induziert resistenten Pflanzen zeigten höhere Assimilationsraten über einen längeren Zeitraum im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen bei etwa gleichem Befall. Außerdem war die Verlagerung von markiertem CO<sub>2</sub> aus den Fahnenblättern in die Ähren nicht beeinflusst von dem Pathogen.

Nach WITTMANN und SCHÖNBECK (1996) führte die Behandlung von Weizenpflanzen mit B 50 zu einer Toleranzinduktion sowohl gegenüber *Erysiphe graminis* unter erheblicher Erhöhung des Tausendkorngewichts und des Strohertrags als auch gegenüber *Rhopalosiphum padi* unter signifikanter Erhöhung des Kornertrags. Die Toleranzinduktion war mit Verschiebungen der Attraktionswirkung des „pathologischen“ Sinks zugunsten des natürlichen Sinks verbunden, was zu einer höheren Biomasseproduktion führte. Während nach Induktorbehandlung der Auxin-Gehalt junger Ähren in Abwesenheit von Aphiden unverändert blieb, war er nach *R. padi*-Befall verdoppelt. Diese Erhöhung des Auxin-Gehaltes führte zu einer positiven Beeinflussung der Anzahl der Endospermzellen und zu höheren Erträgen.

Da das komplexe Kulturfiltrat die Gesamtheit aller Substanzen beinhaltet, die von *B. subtilis* produziert werden, wie z. B. Auxine, Enzyme, Proteine und Peptide, kann der beobachtete positive Effekt der niedrigen Konzentration sowohl auf einen direkten Einfluss auf das Entstehen von Salzschäden, als auch auf eine Toleranzinduktion gegenüber Salzstress beruhen. Um näheren Einblick zu gewinnen, untersuchten wir den Effekt zum einen von Proteinen und Peptiden und zum anderen von Auxinen auf das pflanzliche Wachstum unter Stressbedingungen.

## **6.2 Wirkung von Proteinen und Peptiden**

Die getesteten Fraktionen aus den Kulturfiltraten des Stammes FZB24 hatten generell auch einen positiven, konzentrationsabhängigen Einfluss auf das Spross- und Wurzelwachstum der Sämlinge unter dem Einfluss der hohen Salzbelastung. Insbesondere zeigten die Fraktionen batch-50 2 % und 14-16 20 % aus dem Kulturfiltrat der Übergangsphase, die durch Elution in 50 %-Acetonitril mittels batch-Trennung bzw. 20 %-Acetonitril mittels batch-Trennung und nachfolgender Elution ebenfalls in 20 %-Acetonitril mittels Säulen-Trennung,

sowie die Fraktionen 19-25 0,2 %, 26-31 0,2 % und 32-36 2 % aus dem Kulturfiltrat der 19. h, die durch Elution in 10 %-, 20 %- bzw. 30 %-Acetonitril mittels Säulen-Trennung gewonnen wurden, eine positive Wirkung auf das Wachstum und die Toleranz der Testpflanzen gegenüber Salinität. Da die Natur der Peptide in den Fraktionen der Kulturfiltrate unterschiedlich ist (SCHUSTER 2005) konnte kein Zusammenhang zwischen der Konzentration der Peptide in den Fraktionen und der Wachstumsstimulierung und Toleranzerhöhung der Sämlinge gegenüber Salzstress ermittelt werden.

Auch der Peptidextrakt des Stammes FZB41 hatte einen fördernden, konzentrationsabhängigen Einfluss auf das Wachstum der Tomatensämlinge unter Salzbedingungen. Die höchste angewandte Konzentration von 100 µg/ml hatte dagegen eine toxische Wirkung, die sich in einer Wachstumshemmung des Sprosses und der Wurzel widerspiegelte. Die nächste Konzentration von 10 µg/ml hatte jedoch einen positiven Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen und mit abnehmender Konzentration wurde eine zunehmend positive Wirkung beobachtet bis zur Konzentration von 0,1 µg/ml, welche den größten wachstumsstimulierenden und toleranzerhöhenden Einfluss zeigte. Weitere Verdünnungen bis zur Konzentration von 0,001 µg/ml führten zu einer Abnahme des weiterhin positiven Einflusses auf das Wachstum der Sämlinge. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Mitteilung von KREBS (2003), dass die Wirksamkeit der gereinigten Iturin-ähnlichen Peptide, welche auch von *B. amyloliquefaciens* DSM 10273 produziert werden (KREBS et al. 1996), hinsichtlich der pflanzlichen Wachstumsförderung in dem Bereich <10 µg/ml liegt.

Da es in der Literatur keine Hinweise auf einen direkten Einfluss von Peptiden und Proteinen auf das Entstehen von Salzschäden gibt, kann die positive Wirkung der Peptide, die von *B. subtilis*-Stämmen produziert werden nur mittelbar auf eine Toleranzinduktion durch Wachstumsverbesserung der Pflanzen zurückgeführt werden.

Eine unmittelbare Resistenz- bzw. Toleranzinduktion bei Pflanzen durch Stoffwechselprodukte von *B. subtilis* gegenüber abiotischen Stressoren ist noch nicht untersucht worden, gegen biotische Stressoren aber in der Literatur oft beschrieben. So beobachtete DOLEJ (1998) durch die Anwendung der Subfraktion G3, die nach Essigsäureethylesterextraktion aus dem Kulturfiltrat der fermentativen Übergangsphase eines FZB *B. subtilis*-Stammes gewonnen wurde mit nachfolgender HPLC-Trennung, eine Wachstumsstimulierung bei Tomatensämlingen und eine Resistenzinduktion gegenüber *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Die positive Wirkung der G3 Fraktion variierte jedoch mit der angewandten Konzentration. Die Untersuchungen von ALEMAYEHU (1997) bei Suspensionskulturen mit Wildtomatenzellen bestätigen die wachstumsfördernde und insbesondere die toleranzerhöhende Wirkung gegenüber Fusarinsäure dieser Fraktion aus

dem Kulturfiltrat des Stammes FZB14 und belegen eine Auxin-ähnliche Aktivität.

GUPTA et al. (2000) konnten mittels Gelchromatographie eine Fraktion, Tr-C, aus dem Kulturfiltrat der Übergangsphase des *B. subtilis*-Stammes FZB14 gewinnen, deren Anwendung in 2 %-Konzentration eine erhebliche Stimulierung des Wurzelwachstums von Tomatensämlingen und auch eine signifikante Resistenz- oder Toleranzerhöhung gegenüber *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* induzierte. Die 1 %-Konzentration von Tr-C zeigte jedoch keine vergleichbare Wirkung. Eine beobachtete Ähnlichkeit zwischen den Eigenschaften von Tr-C und Indol-3-pyruvat (IPyA) führte zu der Schlussfolgerung, dass Tr-C einen Elicitor enthält, der IPyA ähnelt und an der Signalauslösung und -transduktion oder der Aktivierung eines Abwehrgens beteiligt ist.

Auch KILIAN et al. (2000) demonstrieren die toleranzerhöhende Wirkung des Stammes FZB24 gegenüber biotischen Stressoren. Sie vertreten die Meinung, dass die Produktion von Proteasen durch *B. subtilis* zu einer Freilassung von Fragmenten aus pflanzlichen Zellwänden führen könnte, die als Signalstoffe für eine Resistenzinduktion dienen.

### **6.3 Wirkung von Auxinen**

Die von uns getesteten Auxine hatten insgesamt deutlich erkennbare positive Effekte auf das Wachstum, die Adventivwurzelbildung und den Wassergehalt der Testpflanzen, abhängig von der Auxin-Form, der Konzentration und der Applikationsmethode.

Die Auxin-Präkursoren bewirkten eine deutliche Salztoleranzerhöhung bei der Testpflanze, die durch eine Stimulierung des Spross- und Wurzelwachstums und der Adventivwurzelbildung (Bewurzelungsrate, Wurzelanzahl und Wurzellänge), sowie durch eine Erhöhung des Wassergehaltes im Spross und in der Wurzel der Testpflanzen unter Salzstress erkennbar war. Das Auxin selbst bzw. die IAA zeigte positive Effekte nur hinsichtlich einer Induktion neuer Wurzeln unter Salzstress, durch eine Förderung der Bewurzelungsrate und der Wurzelanzahl im Test zur Bestimmung der Adventivwurzelbildung, während die Wurzellänge bei den getesteten Hypokotylsegmenten negativ beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Abgabe von Auxin-Präkursoren durch *B. subtilis* bei Besiedlung der Pflanze eine verstärkte Biosynthese des Phytohormons innerhalb der Pflanze induzieren könnte. Eine höhere IAA-Biosynthese in der Pflanze, die möglicherweise direkt in der bakteriisierten Wurzel stattfindet, die nach TAIZ und ZEIGER (2000) ein Ort der IAA-Biosynthese ist, könnte trotz Salzstress ein verbessertes Wurzelwachstum bei den Pflanzen bewirken und folglich eine höhere Wasseraufnahme, wie durch die Erhöhung des Wassergehaltes gezeigt werden konnte.

Verständnis für diesen toleranzerhöhenden Prozess ließe sich aus der pflanzlichen Auxin-Biosynthese ableiten. Die IAA-Biosynthese erfolgt bei Pflanzen vorwiegend in den Apikalmeristemen des Sprosses, in jungen Blättern und reifenden Früchten und, wenn auch in geringeren Raten, in reifen Blättern und Wurzelspitzen. Es ist vielfach bewiesen, dass Pflanzen Tryptophan (TRP) über mehrere Stoffwechselwege in IAA umwandeln (TAIZ und ZEIGER 2000). Unter diesen Stoffwechselwegen ist die L-TRP-abhängige IAA-Biosynthese die am meisten charakterisierte Umwandlung (FRANKENBERGER und ARSHAD 1995). Radioaktive Markierungen in Zusammenhang mit der Beobachtung, dass D-TRP das Sämlingswachstum effektiver stimulierte als L-TRP, führten zu der Hypothese, dass das D-Isomer für die pflanzliche IAA-Synthese verwendet wird. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass die Pflanzen nur L-TRP in IAA umwandeln können (NORMANLY et al. 1995). Der bedeutendste Tryptophan-abhängige Biosyntheseweg ist der Indol-3-pyruvat (IPyA)-Weg (Abb. 33), in dem TRP zu IPyA desaminiert und dann zu Indol-3-acetaldehyd (IAAld) decarboxyliert wird (TAIZ und ZEIGER 2000). Das Enzym IPyA-Decarboxylase wandelt IPyA in IAAld um, das schließlich in IAA metabolisiert wird. Ein alternativer Weg der IAA-Biosynthese könnte in manchen Pflanzen über den Tryptamin (TAM)-Weg verlaufen, d. h. über Decarboxylierung von TRP zu TAM und nachfolgender oxidativer Desaminierung zu IAAld, welches dann direkt in IAA metabolisiert wird (NONHEBEL et al. 1993). DE LUCA et al. (1989) haben das Enzym TRP-Decarboxylase, welches die Umwandlung von L-TRP zu TAM katalysiert, sequenziert und kloniert. Im Indol-3-acetonitril (IAN)-Weg wird TRP zuerst in Indol-3-acetaldoxim (IAOX) und dann in IAN metabolisiert (TAIZ und ZEIGER 2000). Dann wird IAN durch das Enzym Nitrilase in IAA umgewandelt (NORMANLY et al. 1997). Da aber die Verbreitung von Nitrilase begrenzt ist, wird die Bedeutung dieses Enzyms als gering eingestuft (NONHEBEL et al. 1993). IAN und andere Zwischenprodukte des IAN-Stoffwechselweges wurden hauptsächlich in der Familie Brassicaceae nachgewiesen, weshalb dieser Reaktionsweg von geringer Bedeutung zu sein scheint (NORMANLY et al. 1995). Manche pflanzenassoziierten Mikroorganismen, wie evtl. auch *B. subtilis*, nutzen auch den IAN-Weg um IAA zu synthetisieren. Sie wandeln IAN in IAA um durch eine Nitrilase, oder eine Nitril-Hydratase und eine Amidase (NORMANLY et al. 1997). Manche phytopathogene Bakterien, wie *Pseudomonas savastanoi* und *Agrobacterium tumefaciens*, nutzen den Indol-3-acetamid (IAM)-Weg. In diesem Biosyntheseweg wird TRP durch das Enzym TRP-Monooxygenase in IAM umgewandelt, welches dann durch die IAM-Hydrolase in IAA metabolisiert wird. Die Auxine, die von diesen Bakterien gebildet werden erzeugen oft krankhafte morphologische Veränderungen bei den Wirtspflanzen (TAIZ und ZEIGER 2000). Untersuchungen mit TRP-Mutanten haben kürzlich die Existenz eines TRP-unabhängigen IAA-Biosyntheseweges gezeigt, der sich wahrscheinlich bei Indol oder seiner Vorstufe Indol-

3-glycerinphosphat vom TRP-abhängigen Biosyntheseweg verzweigt (NORMANLY et al. 1995). Das verändert jedoch nicht die Tatsache, dass viele Pflanzen TRP in IAA umwandeln können, teilweise in wichtigen Mengen für den pflanzlichen Auxinhaushalt (BANDURSKI et al. 1995).

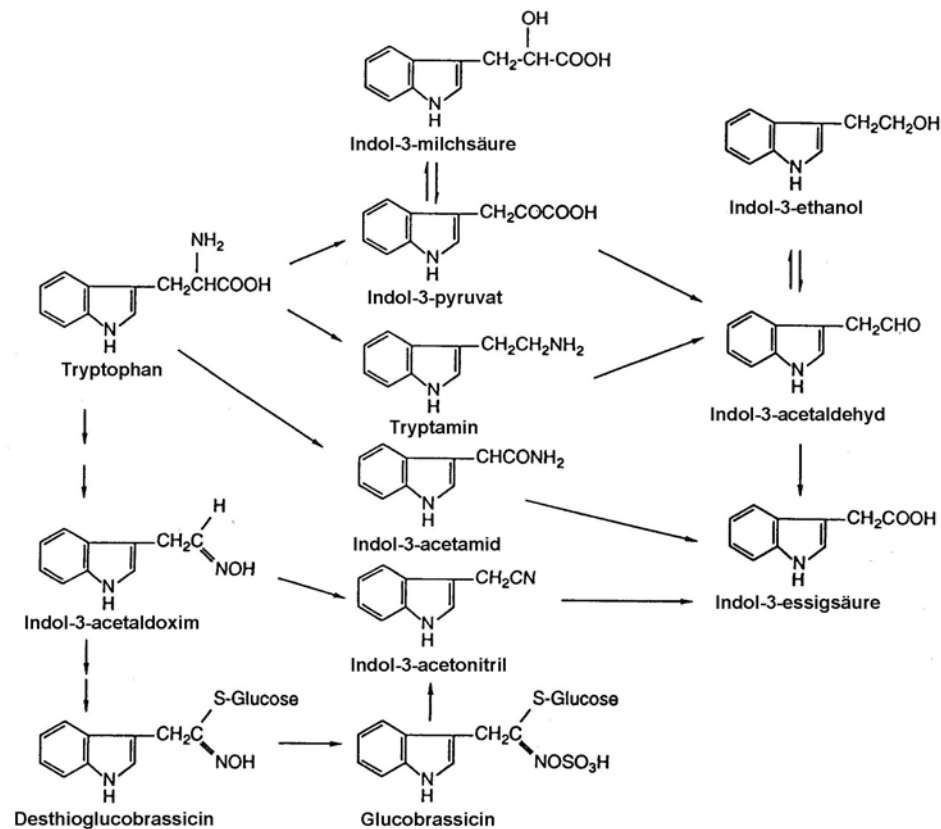


Abb. 33: Tryptophan-abhängige Biosynthesewege der Indol-3-essigsäure (nach FRANKENBERGER und ARSHAD 1995)

Nach SCHNEIDER et al. (1972) könnte die Indol-3-essigsäure (IAA)-Biosynthese in der Tomate über den Tryptamin (TAM)-Weg erfolgen, da sie Tryptophan (TRP), TAM, IAA und in geringer Menge auch das instabile Indol-3-acetaldehyd (IAAld) in Tomatensprossen nachweisen konnten. Und obwohl der Nachweis von Indol-3-pyruvat (IPyA) und Indol-3-acetonitril (IAN) erfolglos war, wird der IPyA-Weg nicht ausgeschlossen aufgrund der Unstabilität von IPyA und der damit verbundenen Schwierigkeiten. Sie berichten, dass Tomatenpflanzen die höchsten IAA-Gehalte in vegetativem Gewebe aufweisen. COONEY und NONHEBEL (1991) vertreten die Meinung, dass IPyA der wichtigste oder einzige Präkursor in Tomatensprossen sein könnte, da IPyA der meist markierte Bestandteil war und auch in ähnlichen Mengen mit IAA nachgewiesen wurde. TAM konnte ebenfalls isoliert und

charakterisiert werden und ist deshalb auch ein mögliches Zwischenprodukt der IAA-Biosynthese in der Tomate, jedoch nicht das hauptsächliche, wie durch Deuterium-Markierung demonstriert wurde. Indol-3-acetaldoxim (IAOX) konnte nicht nachgewiesen werden, könnte jedoch in geringen Mengen, ein nativer Bestandteil der Tomate sein. Nach NONHEBEL et al. (1993) ist IPyA ein nativer Bestandteil der Tomate und wahrscheinlich der Hauptpräkursor von IAA, denn die Markierungsrate von IPyA war exakt vereinbar mit der Markierungsrate von IAA, das deckt sich interessanterweise mit unseren Versuchserfahrungen. TAM wurde ebenfalls als endogener Bestandteil der Tomate nachgewiesen und kann bei exogener Applikation sogar in IAA umgewandelt werden, zeigte aber eine ähnliche Markierungsrate wie die von IAA und ist deshalb wahrscheinlich kein Präkursor des Phytohormons, sowie IAOX, dessen Nachweis erfolglos war. TRP ist dagegen ein IAA-Präkursor in der Tomate.

Bei der Wurzelapplikation der Auxin-Präkursoren in unseren Versuchen wurde unter Salzstress insgesamt eine Förderung des Wurzelwachstums durch hohe Konzentrationen und des Sprosswachstums durch niedrige Konzentrationen beobachtet. Bei der Blattapplikation dagegen stimulierten die hohen Konzentrationen das Sprosswachstum. Das deutet auf eine unterschiedliche Sensitivität des Sprosses und der Wurzel gegenüber den getesteten Auxinen hin.

Es zeigte sich in unseren Tests auch deutlich eine toleranzerhöhende Wirkung bei der Wurzelapplikation der IAA-Präkursoren, die erhebliche Wachstumsverbesserungen beim Spross und bei der Wurzel der Pflanzen bewirkte, während die Blattapplikation nennenswerte Auswirkungen ausschließlich beim Spross zeigte. Die fehlende systemische Wirkung der IAA-Präkursoren bei der Blattapplikation beruht möglicherweise auf der Empfindlichkeit dieser Substanzen gegenüber Licht und Sauerstoff, da davon ausgegangen werden kann, dass die IAA-Präkursoren diesen Faktoren mehr ausgesetzt waren bei dieser Applikationsart. Außerdem wurde in unseren Tests kein Benetzungsmittel verwendet und in Verbindung mit der kürzeren Einwirkungsdauer der Substanzen bei der Blattapplikation kann eine verminderte Aufnahme der Testsubstanzen angenommen werden.

Auch andere Untersuchungen demonstrieren eine Erhöhung der Salztoleranz bei monokotylen Pflanzen durch Samenbehandlung mit natürlichen und synthetischen Auxinen oder Zusatz der Substanzen in das Medium. So konnten DARRA und SAXENA (1973) die Salztoleranz von Mais durch Samenbehandlung mit IAA erhöhen. Die Samenquellung erfolgte in 50-300 ppm IAA und die Samen wurden anschließend in Böden mit niedriger (E. C.  $2,35 \times 10^3$ ), mäßiger (E. C.  $5,85 \times 10^3$ ) und hoher Salinität (E. C.  $8,2 \times 10^3$ ) gesät. Die IAA-Behandlung führte zu teilweise erheblichen Erhöhungen des Ertrags, der Aufnahme von N, P, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> und Mg sowie der Halmproduktion im Verhältnis zur Kontrolle. Die Na<sup>+</sup>-Aufnahme

wurde dagegen negativ beeinflusst. Auch Untersuchungen von FRANKE und HASSANEIN (1976) belegen eine positive Beeinflussung der Salztoleranz von Mais durch Saatgutbehandlung mit Naphthyllessigsäure (NAA). Durch Samenquellung in 50-380 ppm  $\alpha$ -NAA und anschließender Übertragung in Gefäßen mit 0,1-0,3 % NaCl erzielten sie teilweise signifikante Erhöhungen der Sprosstrockenmasse der Pflanzen gegenüber der Kontrolle im Stadium der Keimung, des Auflaufs und der Jugendentwicklung. Die deutlichste positive Wirkung wurde bei hoher Substratversalzung beobachtet. Durch Einquellen von Karyopsen in  $\alpha$ -NAA-Lösungen erzielte ROTH (1981) erhebliche Erhöhungen der Wurzeltrockenmasse von Sommerweizen bei 0,1 und 0,2 % NaCl, während die Sprosstrockenmasse negativ beeinflusst wurde. BASTIANPILLAI et al. (1982) berichten über eine Salztoleranzerhöhung bei Weizen nach Samenbehandlung und nachfolgender Blattapplikation von 1-NAA im Gewächshaus. Der positive Effekt von 1-NAA war jedoch auf die Bestockung der Pflanzen beschränkt. Eine Erhöhung der Salztoleranz durch 1-NAA konnte auch bei Gerste und Reis durch Samenbehandlung erzielt werden. Bei Gerste wurde durch Applikation von 500 und 1000 ppm 1-NAA die Wurzeltrockenmasse bei 0,1 und 0,2 % NaCl gefördert. Bei Reis konnte nur bei 0,1 % NaCl sowohl die Spross-, als auch die Wurzeltrockenmasse positiv beeinflusst werden (ROTH 1985). Die positive Wirkung von 490  $\mu$ M TRP und 5,7  $\mu$ M IAA nach Zusatz im Medium auf die Kallusregeneration von 2 japonica- und 2 indica-Reissorten mit unterschiedlicher Salztoleranz bei 50 mM und 100 mM NaCl demonstrieren LUTTS et al. (1999). Beide NaCl-Konzentrationen hatten einen stark hemmenden Einfluss auf die Regenerationshäufigkeit bei allen Sorten, zeigten jedoch keinen deutlichen Effekt auf die Bewurzelung der Pflänzchen. TRP stimulierte die Sprossregeneration (Regenerationshäufigkeit und Anzahl der Pflänzchen/regenerierten Kallus) und die nachfolgende Überlebensrate der regenerierten Pflänzchen bei allen Sorten und beiden NaCl-Konzentrationen. IAA dagegen reduzierte die Sprossregeneration, stimulierte aber die Wurzelregeneration bzw. Bewurzelungsrate bei allen Sorten und beiden NaCl-Konzentrationen.

Bei niederen Pflanzen wie Meeresalgen *Caloglossa leprieurii*, *Rhizoclonium implexum* und *Bostrychia binderi* und die Frischwasseralge *Pithophora* sp. zeigte sich eine IAA-Behandlung durch Zusatz im Medium ebenfalls effektiv in der Erhöhung der Salztoleranz (NOWAK et al. 1988).

Auch bei dikotylen Pflanzen gibt es Hinweise über eine Implikation von Auxinen in pflanzliche Salztoleranz. LE DILY et al. (1990) unterstreichen die Bedeutung von Auxinen und Cytokinen bei der Salztoleranz von Zuckerrüben. 68 mM NaCl stimulierten das Wachstum von Zuckerrüben-Kallus, der bis zu 137 mM NaCl tolerierte. Das Wachstum von Auxin- und Cytokinin-unabhängigem Kallus dagegen, wurde unter 34 mM NaCl stimuliert, während 68-



274 mM NaCl hemmend wirkten oder letal waren. Die NaCl-Empfindlichkeit des Auxin- und Cytokinin-unabhängigen Kallus beruht nicht auf mangelnder Regulierung des osmotischen Potenzials. Vielmehr wird als Ursache ein Wasserverlust betrachtet, der durch die Senkung des osmotischen Potenzials entsteht in Verbindung mit Veränderungen der Membranpermeabilität. Einen weiteren Hinweis auf die Rolle von Auxin in der pflanzlichen Salztoleranz geben die Untersuchungen QAZI und HASNAIN (1994). Sie transformierten das Ti-Plasmid virulenter salztoleranter Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* in Kalli von *Brassica oleracea*. Konjugationstests zeigten dass die Salztoleranz der verwendeten Stämme durch dieses Plasmid vermittelt wurden. Die transformierten Kalli waren salztolerant und hatten ohne Zusatz von Auxin im Medium 2fach bis 4,5fach höheren Auxingehalt als die Kontroll-Kalli unter Zusatz von Auxin. Zudem wurden zusätzliche Polypeptide in den transformierten Kalluskulturen nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den positiven Effekten, die durch Samenbehandlung oder Zusatz von Auxinen im Medium festgestellt wurden, zeigen die Ergebnisse von SALAMA et al. (1981), dass eine Blattapplikation von 50 ppm IAA auf Tomatenpflanzen dem negativen Effekt von Salzstress (-3, -7 und -10 bars, NaCl und CaCl<sub>2</sub>) nicht entgegenwirken konnte. Die salzinduzierte Erhöhung der Na<sup>+</sup>-Konzentration in der Pflanze war jedoch durch IAA verhindert. Die K<sup>+</sup>-Konzentration zeigte einen unregelmäßigen Trend, ebenso wie die Mg-Konzentration, wurde aber gefördert durch IAA. Die Ca<sup>++</sup>-Konzentration wurde erhöht durch Salz und blieb unverändert nach IAA-Applikation.

Obwohl wenig Informationen zur Verfügung stehen über Auxinwirkungen in Stress- oder Abwehrreaktionen (CHEONG et al. 2002), lassen einige Untersuchungen auf Interaktionen zwischen den molekularen Mechanismen schließen, die in der Auxinwirkung und den pflanzlichen Reaktionen gegenüber Trockenheit beteiligt sind. Auxin-unempfindliche Mutanten aus *Arabidopsis thaliana* zeigten z. B. differenzierte Proteinexpression gegenüber Trockenheit im Vergleich zum Wildtyp (LEYMARIE et al. 1996).

Nach SEAL et al. (2001) führte eine Entwässerung durch Behandlung mit 250 mM NaCl oder Saccharose oder Exposition in Luftströmung bei einer Auxin-autotrophen, nur unter Zusatz von 6-Benzylaminopurin (BAP) kultivierten Suspensionskultur aus *Arachis hypogea*, zu einem Verlust der zellulären Wachstumsfähigkeit. Im Gegensatz dazu konnten Zellen, die unter Zusatz von NAA und BAP kultiviert wurden ihr normales Wachstum nach einer solchen Behandlung fortsetzen. Eine Behandlung der Auxin-autotrophen Kultur mit NAA konnte das Wachstum dieser Zellen komplett wiederherstellen und ihre Stressempfindlichkeit ausschalten. NAA konnte den Stress nicht vermeiden, führte aber zu einer erhöhten Stresstoleranz durch die Unterstützung bei der Erholung nach dem Wasserverlust.

Andere Untersuchungen, wie die von CHEN und SINGH (1999), lassen auf Interaktionen

zwischen Auxinwirkung und generellen Stressreaktionen schließen. Glutathion-S-Transferasen (GSTs) sind multifunktionelle Enzyme mit wichtigen Funktionen in pflanzlichen Stressreaktionen und so genannte ocs Elemente sind Enhancer-Sequenzen in manchen Pathogen- und GST-Promotoren. Das ocs Element im *GST6* Gen aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine Rolle in der Expression des *GST6* Gens, insbesondere in Wurzelgeweben, spielt, ist induzierbar durch 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4D).

Einen direkten Einfluss von Auxin auf die pflanzliche  $K^+$ -Aufnahme, die nach XIONG und ZHU (2004) durch hohe  $Na^+$ -Konzentrationen generell gehemmt wird und mitverantwortlich ist für die Wachstumshemmung und die verminderte Vitalität salzgestresster Pflanzen, belegen die Untersuchungen von PHILIPPAR et al. (1999). Sie isolierten 2  $K^+$ -Kanäle, ZMK1 und ZMK2, aus Maiskoleoptilen und charakterisierten sie. Mittels Auxanometer konnte das Streckungswachstum von Maiskoleoptilen nach Applikation verschiedener Indol-3-essigsäure (IAA)-Konzentrationen unter gleichzeitiger mRNA-Isolierung gemessen und gezeigt werden, dass die Transkription von *ZMK1*, nicht *ZMK2*, abhängig ist von der IAA-Konzentration. In speziellen Untersuchungen wurde eine zeitabhängige Erhöhung der Dichte der aktiven einwärts-gleichrichtenden  $K^+$ -Kanäle durch 1-Naphthylthylthessigsäure (1-NAA) beobachtet und als wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen eine auxininduzierte Erhöhung der Anzahl der aktiven Kanäle als Folge einer Fusion von neu synthetisierten  $K^+$ -Kanälen im Plasmalemma angeführt. PHILIPPAR et al. (2004) demonstrieren auch eine Erhöhung der Transkriptabundanz der einwärts-gleichrichtenden  $K^+$ -Kanäle der Shaker-Familie *KAT1* und *KAT2* nach Exposition von *Arabidopsis*-Sämlingen in 10  $\mu$ M IAA oder 1-NAA. Die Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung der Regulierung von *KAT1* durch Auxin in dem Streckungswachstum von *Arabidopsis thaliana* schließen. Da in Kotyledonen, Blätter und Hypokotylen aus *A. thaliana* hohe Auxinkonzentrationen zu Zellteilung und niedrige Auxinkonzentrationen zu Zellstreckung führen (LJUNG et al. 2001), ist die Expression von *KAT1* in etiolierten Hypokotylen mit niedriger Auxinkonzentration und Zellstreckung verbunden.

In unseren Tests zu Ermittlung der Aufnahme und des Transportes von Auxinen wurde in Abwesenheit von Salz ein endogener IAA-Gehalt von 2,04 nmol/g Trockenmasse nach 2-tägiger Kultivierung der Segmente gemessen oder 35,7 ng/g Frischmasse, da bei dem verwendeten Material 1 g Trockenmasse 10 g Frischmasse entspricht und IAA ein Molekulargewicht von 175,2 g hat. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von WIGHTMAN und LIGHTY (1982), die einen IAA-Gehalt von 37 ng/g Frischmasse in 6 Wochen alten Tomatensprossen ermittelt haben. SCHNEIDER et al. (1972) berichten von einem vergleichbaren IAA-Gehalt von 50 ng/g Frischmasse in 6 Wochen alten Tomatensprossen. COONEY und NONHEBEL (1991) konnten dagegen einen IAA-Gehalt

von durchschnittlich nur 7,9 ng/g Frischmasse in 4-5 Wochen alten Tomatensprossen ermitteln.

Obwohl Hypokotylsegmente aus Tomaten für den Auxin-Stoffwechsel untypisch sind, da sie eine relativ geringe IAA-induzierte Streckung zeigen und keine Hemmung des Streckungswachstums bei hohen IAA-Konzentrationen aufweisen (KELLY und BRADFORD 1986), zeigte der Test eine salzinduzierte Hemmung des IAA-Gehaltes. Das deckt sich mit den Ergebnissen von EL-ANTABLY et al. (1994), die den endogenen Gehalt von Auxinen bei Tomatenblättern 15-105 Tagen nach der Umpflanzung bei 3000 ppm, 4000 ppm und 5000 ppm NaCl ermittelt haben. Sie demonstrieren eine stärker werdende, jedoch nicht signifikante Hemmung des endogenen Gehaltes von Auxinen mit Erhöhung der NaCl-Konzentration in verschiedenen Wachstumsphasen. Darüber hinaus konnten sie erhebliche Erhöhungen von Auxin-Inhibitoren messen, mit steigender Tendenz bei höheren NaCl-Konzentrationen und fortschreitendem Alter der Pflanzen. Auch NAQVI und ANSARI (1974) konnten eine Abnahme des Auxingehaltes in Maiskoleoptilen von etwa 28 % unter Salzstress (0,4 w/v NaCl) messen. Nach MUNNS (1993) beschleunigt die fortschreitende Akkumulation von Salzen in älteren Blättern die Seneszenz und der Verlust dieser Blätter führt zu gestörter Versorgung von Phytohormonen oder Assimilaten in den wachsenden Regionen, was eine Beeinträchtigung des Wachstums zu Folge hat.

Die Hemmung des endogenen Auxin-Gehaltes in pflanzlichen Geweben scheint eine generelle oder zumindest weit verbreitete Stressreaktion zu sein, nicht nur im Verbindung mit Salinität, sondern auch mit anderen abiotischen Stressfaktoren wie z. B. Wasserstress, Kälte und Verwundung. So verweisen GUINN und BRUMMETT (1988) auf eine Erhöhung der IAA-Esterbildung unter gleichzeitiger Abnahme des freien IAA-Gehaltes in Samenkapseln von Baumwollpflanzen und ihren Trennungsschichten nach Wasserstress. MICHAELI et al. (1999) konnten eine Hemmung des freien IAA-Gehaltes in Trennungsschichten und Blattspreiten von *Ixora coccinea* nach einer 3-tägigen Kältebehandlung bei 7°C messen. Die Abnahme des IAA-Gehaltes wird, zumindest teilweise, auf erhöhte IAA-Decarboxylierung und reduzierte Transportfähigkeit von Auxin zurückgeführt, die durch sekundären oxidativen Stress ausgelöst werden. Da über die Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach Exposition in unterschiedliche Stressbedingungen berichtet wird, ist oxidative Decarboxylierung von IAA in gestresstem Gewebe zu erwarten, oder jedes Mal wenn sich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akkumuliert. Nach CHEONG et al. (2002) führt auch Verwundung zu Hemmung des endogenen IAA-Gehaltes durch die Aktivierung von Genen, die IAA-Glucosyltransferasen codieren, Enzyme die verantwortlich sind für die Bildung von IAA-Zucker-Verbindungen. Außerdem induziert Verwundung eine Abschwächung der Expression des Nitrilase codierenden Gens, das die Umwandlung von Indol-3-acetonitril (IAN) zu Indol-3-essigsäure (IAA) katalysiert und zur

erhöhten Expression eines Gens führt, das in der negativen Regulierung der IAA-Signalkette beteiligt ist.

COHEN und BANDURSKI (1982) vertreten die Meinung, dass sich eine IAA-Konjugation während der Samenreifung und unter Bedingungen ereignet, die eine Veränderung der pflanzlichen Wachstumsrate herbeiführen. Eine exogene Applikation von Auxinen, wie IAA und Auxin-Präkursoren zu intakten Pflanzen oder pflanzlichen Segmenten führt ebenfalls zur Konjugation. Exposition zu Licht oder Ethylen führte zu Stimulierung der Auxin-Konjugation, allerdings nur bei manchen Pflanzen, während andere keine Reaktion zeigten. Nach NORMANLY et al. (1995) ist der größte Teil von IAA in pflanzlichem Gewebe an Zuckern, Peptiden, Aminosäuren oder *myo*-inositol durch Ester- oder Amidbindungen gebunden, obwohl die Natur der IAA-Konjugate für die meisten pflanzlichen Arten noch unbekannt ist. In Mutanten oder transgenen Pflanzen, die IAA akkumulieren, bleibt der Gehalt an freier IAA normal, während die gebundene IAA akkumuliert wird. Das führt zur Annahme, dass freie IAA die biologisch aktive Form ist und die IAA-Konjugation einen Mechanismus für die Regulierung des Phytohormons darstellt.

Unsere Tests zur Ermittlung der Aufnahme und des Transportes von Auxinen belegen, dass die Abnahme des endogenen IAA-Gehaltes unter Salzbedingungen durch eine exogene IAA-Applikation kompensiert werden kann, was auch für die IPyA zutreffend ist, allerdings in geringerem Maß. Außerdem zeigt die Dynamik des IAA-Gehaltes eine zeitliche Verlagerung des positiven Effektes von exogen applizierter IAA und IPyA unter Salzstressbedingungen.

**Folglich könnte eine IAA- oder IAA-Präkursoren-Abgabe des Rhizobakteriums *B. subtilis* an die Pflanze bei Wurzelbesiedlung, die beobachtete Salztoleranzerhöhung herbeiführen.**

#### **6.4 Pflanzliche Anpassungsmöglichkeiten an Salzstress**

In unserem Gewächshausversuch scheint eine Ursache für die geringere Wirksamkeit der getesteten Auxine, hinsichtlich der Wachstumsförderung, in der nur kurzzeitigen Einwirkung (6 Tage) und der Salzapplikation zu liegen, die stufenweise erfolgte, um ein Absterben der Pflanzen zu vermeiden. Anfangs wurden die Sämlinge im Gewächshaus einer NaCl-Konzentration von 50 mM ausgesetzt, die nach 3 Tagen auf 100 mM erhöht wurde und diese anfängliche Exposition der Pflanzen in einer zur Hälfte reduzierten NaCl-Konzentration könnte zu einer Adaptation bei den Tomatenpflanzen geführt haben, wie z. B. Untersuchungen von CAYUELA et al. (2001) belegen. ROMERO-ARANDA et al. (2001) zeigten ebenfalls, dass eine Salz-Vorbehandlung von Tomatensämlingen im Saatbeet zu

einer Toleranzerhöhung gegen weiteren Salzbedingungen im Feld oder Gewächshaus führten. Sie untersuchten die Beteiligung physiologischer Prozesse der Wachstumshemmung und der verminderten Wasseraufnahme bei Pflanzen unter Salzstress. Auch die Behandlung von Sämlingen mit Polyethylenglycol (PEG) führte in Untersuchungen von BALIBREA et al. (1999b) zu einer Salztoleranzerhöhung bei Tomatenpflanzen.

Bei den adaptierten Pflanzen gegenüber Salinität scheint die Erhöhung der  $K^+$ -Aufnahme eine generelle physiologische Reaktion zu sein. WATAD et al. (1991) demonstrierten z. B. eine Erhöhung der Aufnahmefähigkeit von  $K^+$  in NaCl adaptierten Zellen von *Nicotiana tabacum/gossii* im Vergleich zu nicht-adaptierten.

Nach PALLADINA und SIMCHUK (2005b) erscheint das Plasmalemma als erste zelluläre Barriere gegen Salzstress, konkret gegenüber osmotischem Stress und Ionentoxizität, die durch Salzstress hervorgerufen werden. Diese Wirkung ist abhängig von der  $H^+$ -ATPase, deren Aktivität in salzgestressten Maissämlingen gemessen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass Exposition der Sämlinge gegenüber 50 mM NaCl die Aktivität der  $H^+$ -ATPase stimulierte und gleichzeitig zu einer Erhöhung der  $K^+$ -Aufnahme führte. Exposition zu 100 mM NaCl induzierte dagegen eine Abnahme der Aktivität der  $H^+$ -ATPase im Plasmalemma dieser Zellen, und bewirkte eine Wachstumshemmung bei den Maissämlingen und nach PALLADINA und SIMCHUK (2005a) auch eine Verminderung der  $K^+$ -Aufnahme. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von SHANNON et al. (1987) und gibt einen Einblick in den Vorgang einer begrenzten Adaptation von Pflanzen an mäßigen Salzstress.

## 7      **Schlussfolgerungen**

Mit einem Einsatz von *Bacillus subtilis* als kommerzialisiertes nützliches Rhizobakterium ist es möglich, unter optimalen Entwicklungsbedingungen für die Bakterien, eine pflanzliche Stresstoleranz gegenüber Salinität zu erhöhen.

Diese Stresstoleranzerhöhung bei Pflanzen gegenüber einer Substratversalzung nach Anwendung von *B. subtilis* scheint vorrangig durch Abgabe bakteriell produzierter Auxine - hauptsächlich Auxin-Präkursoren - an die Pflanze, mit Stimulierung der pflanzlichen Auxin-Biosynthese zustande zu kommen.

Es sollte weiter untersucht werden, ob ähnlich der beobachteten Toleranzerhöhung gegenüber Salzstress auch gegenüber anderen abiotischen Stressoren (Trockenheit, Temperaturextreme) pflanzliche Toleranzverbesserungen durch den Einsatz von *B. subtilis* erreicht werden können und zu welchen Applikationszeiten bzw. bei welchen Applikationsintervallen die besten Effekte zu erreichen sind.

## 8 Zusammenfassung

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der toleranzerhöhenden Wirkung gegenüber Salinität des Pflanzenwurzeln besiedelnden PGPR *Bacillus subtilis* wurden bakterielle Stoffwechselprodukte der Stämme FZB24 und FZB41 bei der Testpflanze Tomate unter dem Einfluss von hohem Salzstress getestet.

Das Kulturfiltrat aus der fermentativen Übergangsphase mit der Gesamtheit der von *B. subtilis* produzierten Stoffwechselprodukte zeigte im axenischen Test zur Ermittlung des Wachstums anhand der Parameter Länge, Frischmasse und Trockenmasse des Sprosses und der Wurzel sowie Blattfläche, nach 7-tägiger Behandlung von Tomatensämlingen und nachfolgender Kultivierung unter hohem Salzstress eine gewisse toleranzerhöhende Wirkung bei 0,1 %-Konzentration. Zur Produktaufschlüsselung wurde das Kulturfiltrat über Adsorberharz und HPLC fraktioniert. Diese Fraktionen, sowie die aus dem Kulturfiltrat nach 19 h Fermentation wurden ebenfalls bei Tomatensämlingen axenisch getestet. Fraktionen mit verschiedenen Proteinen und Peptiden, die von *B. subtilis* produziert werden, zeigten teilweise eine konzentrationsabhängige Wirkung hinsichtlich der pflanzlichen Wachstumsstimulierung und zugleich Toleranzerhöhung gegenüber Salzstress, weshalb nachfolgend ein Peptidextrakt aus *B. subtilis* mit speziell konzentrierten Peptiden einer Testung im axenischen System unterzogen wurde. Der Peptidextrakt zeigte gleichfalls eine erkennbare konzentrationsabhängige Wirkung.

Mit gleichem axenischen Testsystem wurden Auxin-Präkursoren und Auxin selbst, die als Stoffwechselprodukte von *B. subtilis* nachgewiesen sind, sowohl als Wurzelbehandlung, wie auch als Blattbehandlung bei Tomatensämlingen geprüft. Zusätzlich wurde die Wirkung der Auxine auf den Wassergehalt der Sämlinge unter Salzstress, sowie die Adventivwurzelbildung anhand der Parameter Bewurzelungsrate, Wurzelanzahl und Wurzellänge von Hypokotylsegmenten aus etiolierten Tomatensämlingen in Anwesenheit und Abwesenheit von Salinität getestet. Darüber hinaus wurde die Aufnahme und der Transport von Auxinen, ebenfalls bei Sprosssegmenten aus etiolierten Tomatensämlingen in Anwesenheit und Abwesenheit von Salinität, mittels des Enzymimmuntests (ELISA) geprüft.

Schließlich wurde die Wirkung der Auxine auf das Wachstum anhand der Parameter Frischmasse und Trockenmasse des Sprosses und der Wurzel, Sprosslänge und Blattfläche, sowie den Wassergehalt, in einer Tomatenhydrokultur unter Gewächshausbedingungen unter Salzstress ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass namentlich Auxin-Präkursoren und z. T. Auxin als Stoffwechselprodukte von *B. subtilis* eine Erhöhung der Salzstresstoleranz bei der Testpflanze Tomate herbeiführen können, wenngleich die Wirkung auf die pflanzliche Salztoleranz sehr differenziert und unterschiedlich stark ausgeprägt war.

Der vorhandene Effekt vor allem der Auxin-Präkursoren wird als offenbar bedeutendster Mechanismus für die wachstumsstimulierende und zugleich toleranzerhöhende Wirkung gegenüber Salinität des Rhizobakteriums bei Wurzelbesiedlung und Interaktion mit dem pflanzlichen Stoffwechsel diskutiert.



## 9 Verzeichnisse

### 9.1 Literaturverzeichnis

- ALEMAYEHU, M. (1997): Untersuchungen über Vorkommen und Bedeutung Auxin- und Cytokinin-aktiver Stoffwechselprodukte bei phytosanitär wirksamen *Bacillus subtilis*-Isolaten. Diss. Humboldt-Univ. Berlin, S. 137
- AUST, H.-J., BOCHOW, H., BUCHENAUER, H., KLINGAUF, F., NIEMANN, P., PETZOLD, R., PÖHLING, H.M., SCHEINPFLUG, H. und SCHÖNBECK, F. (1993): Glossar Phytomedizinischer Begriffe, Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, Band 3, 2. Auflage. Stuttgart, Ulmer, S. 149
- BALIBREA, M.E., PARRA, M., BOLARIN, M.C. und PEREZ-ALFOCEA, F. (1999a): Cytoplasmic sucrolytic activity controls tomato fruit growth under salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* **26**, S. 561-568
- BALIBREA, M.E., PARRA, M., BOLARIN, M.C. und PEREZ-ALFOCEA, F. (1999b): PEG-osmotic treatment in tomato seedlings induces salt-adaptation in adult plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **26**, S. 781-786
- BANDURSKI, R.S., COHEN, J.D., SLOVIN, J.P. und REINECKE, D.M. (1995): Auxin Biosynthesis and Metabolism. In: DAVIES, P.J. (Hrsg.) Plant Hormones. Kluwer Academic Publishers, S. 39-65
- BASTIANPILLAI, V.A., STARK, C. und FRANKE, G. (1982): The influence of gibberelin (GA<sub>3</sub>), auxin (1-NAA), and cytokinin (Kinetin, 6-FAP) on the salt tolerance of wheat under greenhouse conditions. *Beitr. Trop. Landwirtsch. Veterinärmed.* **20**(4), S. 365-370
- BOCHOW, H. (1995): Mode of action and practical use of *Bacillus subtilis* as complex acting bioproduct. In: MANKA, M. (Hrsg.) Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control. Proceedings of the third meeting of the European Foundation for Plant Pathology, September 5th-9th 1994, Poznan, Poland. Polish Phytopathol. Soc., S. 97-104
- BOCHOW, H. und DOLEJ, S. (1999): Mechanisms of Tolerance Induction in Plants by Root Colonising *Bacillus subtilis* Isolates. In: LYR, H. (Hrsg.) Modern Fungicides and Antifungal Compounds II. 12th Int. Reinhardtsbrunn Symposium, May 24th-29th 1998, Thuringia, Germany. Andover, UK, Intercept, S. 411-416
- BOCHOW, H., DOLEJ, S.T., FISCHER, I. und MELKAMU, A. (1996): Plant Health Promoting Effects by *Bacillus subtilis* and its Modes of Action. In: LYR, H., RUSSELL, P.E. und

- SISLER, H.D. (Hrsg.) Modern Fungicides and Antifungal Compounds. 11th Int. Symposium, May 14th-20th 1995, Thuringia, Germany. Andover, UK, Intercept, S. 549-554
- BOCHOW, H., EL-SAYED, S.F., JUNGE, H., STAVROPOULOU, A. und SCHMIEDEKNECHT, G. (2001a): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. IV. Salt-stress tolerance induction by *Bacillus subtilis* FZB24 seed treatment in tropical vegetable field crops, and its mode of action. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **108**(1), S. 21-30
- BOCHOW, H., KOGEL, K.-H., POEHLING, M., VON ALTEN, H. und WYSS, U. (2001b): Mechanisms of interactions in the system of plant, parasite and beneficial organisms. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **108**(6), S. 626-652
- BOSTOCK, R.M., KARBAN, R., THALER, J.S., WEYMAN, P.D. und GILCHRIST, D. (2001): Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, S. 103-111
- BROWN, M.M. und HO, L.C. (1993): Factors Affecting Calcium Transport and Basipetal IAA Movement in Tomato Fruit in Relation to Blossom-end Rot. *J. Exp. Bot.* **44**(264), S. 1111-1117
- CAYUELA, E., ESTAÑ, M.T., PARRA, M., CARO, M. und BOLARIN, M.C. (2001): NaCl pre-treatment at the seedling stage enhances fruit yield of tomato plants irrigated with salt water. *Plant Soil* **230**, S. 231-238
- CHEN, W. und SINGH, K.B. (1999): The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the Arabidopsis *GST6* promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J.* **19**(6), S. 667-677
- CHEONG, Y.H., CHANG, H.-S., GUPTA, R., WANG, X., ZHU, T. und LUAN, S. (2002): Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129**(2), S. 661-677
- COHEN, J.D. und BANDURSKI, R.S. (1982): Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, S. 403-430
- COOK, R.J. und BAKER, K.F. (1989): The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens, 2. Auflage. St. Paul, Minnesota, American Phytopathol. Soc., S. 539
- COONEY, T.P. und NONHEBEL, H.M. (1991): Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: Measurement, mass-spectral identification and incorporation of  $^2\text{H}$  from  $^2\text{H}_2\text{O}$  into indole-3-acetic acid, D- and L-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine.

- DARRA, B.L. und SAXENA, S.N. (1973): Role of IAA on the mineral composition of maize (*Zea mays*) crop under various osmotic stressed conditions. *Plant Soil* **38**, S. 657-661
- DE LUCA, V., MARINEAU, C. und BRISSON, N. (1989): Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: Comparison with animal dopa decarboxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, S. 2582-2586
- DELUMEAU, O., MORÈRE-LE PAVEN, M.-C., MONTRICHARD, F. und LAVAL-MARTIN, D.L. (2000): Effects of short-term NaCl stress on calmodulin transcript levels and calmodulin-dependent NAD kinase activity in two species of tomato. *Plant Cell Environ.* **23**, S. 329-336
- DOLEJ, S. (1998): Wirkungen von Stoffwechselprodukten des Rhizobakteriums *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn im Pathosystem Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) - *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker. Diss. Humboldt-Univ. Berlin, S. 144
- DORAIS, M., PAPADOPOULOS, A.P. und GOSSELIN, A. (2001): Influence of electric conductivity management on greenhouse tomato yield and fruit quality. *Agronomie* **21**, S. 367-383
- EL-ANTABLY, H., AMER, M.A., EL-SHAMEY, I. und RAAFAT, A. (1994): Endogenous Growth Substances of Tomato Under Salinization I. Effect of Salinity Stress in Relation to Ontogeny. *Egypt. J. Bot.* **34**(2), S. 199-208
- FRANKE, G. und HASSANEIN, A.E.-H. (1976): Zum Einfluß von GS, CCC, MH und NES auf Keimung und Jugendentwicklung von *Zea mays* L. bei unterschiedlicher NaCl-Substratversalzung. *Beitr. Trop. Landwirtsch. Veterinärmed.* **14**(4), S. 361-367
- FRANKENBERGER, W.T. JR. und ARSHAD, M. (1995): Phytohormones in soils: microbial production and function. New York, Marcel Dekker, S. 503
- GÖHLER, F. und DREWS, M. (1986): Hydroponische Verfahren bei der Gemüseproduktion in Gewächshäusern. IGA-Empfehlungen für die Praxis. Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, S. 53
- GROSCH, R. und GROTE, D. (1998): Unterdrückung von *Phytophthora nicotianae* durch Anwendung von *Bacillus subtilis* in geschlossener erdeloser Tomatenkultur. *Gartenbauwissenschaft*. **63**(3), S. 103-109
- GROSCH, R. und JUNGE, H. (1996): Wirkung verschiedener *Bacillus subtilis*-Stämme gegen *Pythium aphanidermatum* an Gurke und Tomate in hydroponischer Kultur. *Mitt.*

*a.d. Biol. Bundesanstalt f. Land- und Forstwirtschaft* **321**, S. 469

- GROSCH, R., JUNGE, H., KREBS, B. und BOCHOW, H. (1999): Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **106**(6), S. 568-580
- GUINN, G. und BRUMMETT, D.L. (1988): Changes in Free and Conjugated Indole 3-Acetic Acid and Abscissic Acid in Young Cotton Fruits and Their Abscission Zones in Relation to Fruit Retention during and after Moisture Stress. *Plant Physiol.* **86**, S. 28-31
- GUPTA, V.K. und UTKHEDE, R.S. (1986): Factors Affecting the Production of Antifungal Compounds by *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus subtilis*, Antagonists of *Phytophthora cactorum*. *J. Phytopathol.* **117**, S. 9-16
- GUPTA, V.P., BOCHOW, H., DOLEJ, S. und FISCHER, I. (2000): Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against Fusarium wilt. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **107**(2), S. 145-154
- HAJ-BAKRI, F. (1996): Wirkung von Selen auf Wachstum, Selengehalt und Salzstress bei der Buschbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) in Hydrokultur. Diss. Humboldt-Univ. Berlin, S. 128
- IDRIS, E.E. (2002): Investigations on the Genetics of Plant-Growth-Promoting Substances Synthesis by *Bacillus subtilis/amyoliquefaciens* Strains FZB. Diss. Humboldt-Univ. Berlin, S. 136
- IDRIS, E. E., BOCHOW, H., ROSS, H. und BORRISS, R. (2004): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone-like action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyoliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **111**(6), S. 583-597
- KEHLENBECK, H. und SCHÖNBECK, F. (1995): Effects of Induced Resistance on Disease Severity/Yield Relations in Mildewed Barley. *J. Phytopathol.* **143**, S. 561-567
- KEHLENBECK, H., KRONE, C., OERKE, E.-C. und SCHÖNBECK, F. (1994): The effectiveness of induced resistance on yield of mildewed barley. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **101**(1), S. 11-21
- KELLY, M.O. und BRADFORD, K.J. (1986): Insensitivity of the *Diageotropica* Tomato Mutant to Auxin. *Plant Physiol.* **82**, S. 713-717
- KERKEB, L., DONAIRE, J.P., VENEMA, K. und RODRÍGUEZ-ROSALES, M.P. (2001): Tolerance to NaCl induces changes in plasma membrane lipid composition, fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of tomato calli. *Physiol. Plant.* **113**, S. 217-224

- KHALID, A., ARSHAD, M. und ZAHIR, Z.A. (2004): Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* **96**, S. 473-480
- KILIAN, M., STEINER, U., KREBS, B., JUNGE, H., SCHMIEDEKNECHT, G. und HAIN, R. (2000): FZB24<sup>®</sup> *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer* **53**(1), S. 72-93
- KIM, D.-S., COOK, R.J. und WELLER, D.M. (1997): *Bacillus* sp. L324-92 for Biological Control of Three Root Diseases of Wheat Grown with Reduced Tillage. *Phytopathology* **87**, S. 551-558
- KLOEPPER, J.W. (2004): Progress towards implementation of *Bacillus* spp. for plant growth promotion and biological control. Rhizosphere Congress, September 12th-17th 2004, Munich, Germany.
- KLOEPPER, J.W., ZABLOTOWICZ, R.M., TIPPING, E.M. und LIFSHITZ, R. (1991): Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.L. und CREGAN, P.B. (Hrsg.) The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, S. 315-326
- KNOTT, A.G., RUSSELL, A.D. und DANCER, B.N. (1995): Development of resistance to biocides during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, S. 492-498
- KRASKA, T. und SCHÖNBECK, F. (1993): About Changes in the Chromatin Structure after Resistance Induction in *Hordeum vulgare* L. *J. Phytopathol.* **137**, S. 10-14
- KREBS, B. (2003): Persönliche Mitteilung
- KREBS, B., HÖDING, B., KÜBART, S., ALEMAYEHU WORKIE, M., JUNGE, H., SCHMIEDEKNECHT, G., GROSCHE, R., BOCHOW, H. und HEVEST, M. (1998): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **105**(2), S. 181-197
- KREBS, B., OCKHARDT, A., HÖDING, B., BENDZKO, P., MAXIMOV, J. und ETZEL, W. (1996): Peptide, ihre Herstellung und Verwendung sowie Mikroorganismus. Deutsches Patentamt, Offenlegungsschrift DE19641213A1, S. 24
- KREEB, K.H. (1996): Salzstress. In: BRUNOLD, C., RÜEGSEGG, A. und BRÄNDLE, R. (Hrsg.) Stress bei Pflanzen: Ökologie, Physiologie, Biochemie, Molekularbiologie. Haupt, S. 149-172
- LANDY, M., WARREN, G.H., ROSENMAN, S.B. und COLIO, L.G. (1948): *Bacillomycin*: An Antibiotic from *Bacillus subtilis* Active against Pathogenic Fungi. *Proc. Soc. Exp. Biol.*

*Med.* **67**, S. 539-541

- LARCHER, W. (1994): Ökophysiologie der Pflanzen: Leben, Leistung und Streßbewältigung der Pflanzen in ihrer Umwelt, 5. Auflage. Stuttgart, Ulmer, S. 394
- LE DILY, F., HAGEGE, D., BILLARD, J.P., BOUCAUD, J. und GASPAR, T. (1990): Effet du Chlorure de Sodium sur la Croissance et le Potentiel Osmotique de Cals Normaux et Habitues de Betterave Sucrière. *Biol. Plantarum* **32**(4), S. 256-265
- LEEMAN, M., DEN OUDEN, F.M., VAN PELT, J.A., DIRKX, F.P.M., STEIJL, H., BAKKER, P.A.H.M. und SCHIPPERS, B. (1996): Iron Availability Affects Induction of Systemic Resistance to Fusarium Wilt of Radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **86**, S. 149-155
- LEYMARIE, J., DAMERVAL, C., MARCOTTE, L., COMBES, V. und VARTANIAN, N. (1996): Two-Dimensional Protein Patterns of *Arabidopsis* Wild-Type and Auxin Insensitive Mutants, *axr1*, *axr2*, Reveal Interactions between Drought and Hormonal Responses. *Plant Cell Physiol.* **37**(7), S. 966-975
- LJUNG, K., BHALERAO, R.P. und SANDBERG, G. (2001): Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* **28**(4), S. 465-474
- LOEFFLER, W., KATZER, W., KREMER, S., KUGLER, M., PETERSEN, F., JUNG, G., RAPP, C. und TSCHEN, J.S.-M. (1990): Gegen Pilze wirksame Antibiotika der *Bacillus subtilis*-Gruppe. *Forum Mikrobiol.* **3**, S. 156-163
- LUTTS, S., KINET, J.M. und BOUHARMONT, J. (1999): Improvement of rice callus regeneration in the presence of NaCl. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **57**, S. 3-11
- MAAS, E.V. (1986): Salt Tolerance of Plants. *Appl. Agric. Res.* **1**(1), S. 12-26
- MAAS, E.V. und HOFFMAN, G.J. (1977): Crop Salt Tolerance-Current Assessment. *J. Irr. Drain. Div.-ASCE* **103**(IR2), S. 115-134
- MAVROGIANOPOULOS, G., SAVVAS, D. und VOGLI, V. (2002): Influence of NaCl-salinity imposed on half of the root system of hydroponically grown tomato on growth, yield, and tissue mineral composition. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **77**(5), S. 557-564
- MERKYS, A., ANISIMOVENE, N. und PUTRIMAS, A. (1974): Comparative Study of the IAA Content in Systematically Different Plants. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **165**, S. 67-81
- MERTENS, R., EBERLE, J., ARNSCHIEDT, A., LEDEBUR, A. und WEILER, E.W. (1985): Monoclonal antibodies to plant growth regulators. II. Indole-3-acetic acid. *Planta* **166**, S. 389-393

- MICHAELI, R., RIOV, J., PHILOSOPH-HADAS, S. und MEIR, S. (1999): Chilling-induced leaf abscission of *Ixora coccinea* plants. II. Alteration of auxin economy by oxidative stress. *Physiol. Plant.* **107**, S. 174-180
- MITTOVA, V., TAL, M., VOLOKITA, M. und GUY, M. (2002): Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol. Plant.* **115**, S. 393-400
- MUNNS, R. (1993): Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* **16**, S. 15-24
- MURASHIGE, T. und SKOOG, F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15**, S. 473-497
- NAQVI, S.M. und ANSARI, R. (1974): Estimation of Diffusible Auxin Under Saline Growth Conditions. *Experientia* **30**(4), S. 350
- NEWMAN, E.I. (1966): A method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.* **3**, S. 139-145
- NIU, X., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. und PARDO, J.M. (1995): Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol.* **109**, S. 735-742
- NONHEBEL, H.M., COONEY, T.P. und SIMPSON, R. (1993): The Route, Control and Compartmentation of Auxin Synthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* **20**, S. 527-539
- NORMANLY, J., GRISAFI, P., FINK, G.R. und BARTEL, B. (1997): Arabidopsis Mutants Resistant to the Auxin Effects of Indole-3-Acetonitrile Are Defective in the Nitrilase Encoded by the *NIT1* Gene. *Plant Cell* **9**, S. 1781-1790
- NORMANLY, J., SLOVIN, J.P. und COHEN, J.D. (1995): Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant. Physiol.* **107**, S. 323-329
- NOWAK, J., SONAIKE, B. und LAWSON, G.W. (1988): Auxin Induced Stress Tolerance in Algae. *Environ. Pollut.* **51**, S. 213-218
- OCKHARDT, A. (2003): Persönliche Mitteilung
- OERKE, E.-C., STEINER, U. und SCHÖNBECK, F. (1989): Zur Wirksamkeit der induzierten Resistenz unter praktischen Anbaubedingungen V. Mehltreibbefall und Ertrag von Winter- und Sommergerste in Abhängigkeit von der Stickstoffdüngung. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **96**(2), S. 140-153
- PALLADINA, T.A. und SIMCHUK, E.E. (2005a): Regulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-

- ATPase in corn seedling roots by growth regulators in salt environment. 11th International Workshop on Plant Membrane Biology, August 9th-14th 1998, Cambridge, UK, Book of Abstracts, [http://www.192.129.24.144/licensed\\_materials/00898/free/meeting/cmbrdg98/](http://www.192.129.24.144/licensed_materials/00898/free/meeting/cmbrdg98/), gefunden am 27. 04.2005
- PALLADINA, T. und SIMCHUK, E. (2005b): The H<sup>+</sup>-pump function in plasma membranes of corn seedling roots under salt stress conditions. 11th FESPP Congress, September 7th-11th 1998, Varna, Bulgaria, <http://www.bulgaria.com/fespp98/sesabs07.html>, gefunden am 27. 04.2005
- PENNINGSFELD, F. und KURZMANN, P. (1966): Hydrokultur und Torfkultur, Handbuch des Erwerbsgärtners, Band 7. Stuttgart, Ulmer, S. 205
- PHILIPPAR, K., FUCHS, I., LÜTHEN, H., HOTH, S., BAUER, C.S., HAGA, K., THIEL, G., LJUNG, K., SANDBERG, G., BÖTTGER, M., BECKER, D. und HEDRICH, R. (1999): Auxin-induced K<sup>+</sup> channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(21), S. 12186-12191
- PHILIPPAR, K., IVASHIKINA, N., ACHE, P., CHRISTIAN, M., LÜTHEN, H., PALME, K. und HEDRICH, R. (2004): Auxin activates *KAT1* and *KAT2*, two K<sup>+</sup>-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **37**, S. 815-827
- PINKER, I. (1984): Der Einfluß von Licht und Auxin auf die Adventivwurzelbildung von Birken sproßkulturen (*Betula pendula* ROTH) in vitro. Diss. Humboldt-Univ. Berlin, S. 88
- QAZI, S.H.A. und HASNAIN, S. (1994): Transformation and Auxin Independent Growth of *Brassica oleracea* Calli Mediated by Salt Tolerant Oncogenic *Agrobacterium tumefaciens* Strains. *Pak. J. Zool.* **26**(4), S. 293-300
- RAUPACH, G.S. und KLOEPPER, J.W. (1998): Mixtures of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Biological Control of Multiple Cucumber Pathogens. *Phytopathology* **88**, S. 1158-1164
- ROMERO-ARANDA, R., SORIA, T. und CUARTERO, J. (2001): Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci.* **160**, S. 265-272
- ROTH, H. (1981): Ermittlung effektiver Wachstumsregulatoren zur Erhöhung der Salztoleranz von *Triticum aestivum* L. unter Laborbedingungen. *Beitr. Trop. Landwirtsch. Veterinärmed.* **19**(3), S. 319-325



- ROTH, H. (1985): Einsatz von Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>), 1-Naphthylelessigsäure (1-NES) und 6-Furfurylaminopurin (Kinetin) zur Verbesserung der Salztoleranz von *Hordeum vulgare* L. und *Oryza sativa* L. unter Laborbedingungen. *Beitr. Trop. Landwirtschaft. Veterinärmed.* **23**(3), S. 287-294
- ROWELL, D.L. (1997): Bodenkunde: Untersuchungsmethoden und ihre Anwendungen. Springer, S. 614
- RUS, A.M., ESTAÑ, M.T., GISBERT, C., GARCIA-SOGO, B., SERRANO, R., CARO, M., MORENO, V. und BOLARÍN, M.C. (2001): Expressing the yeast *HAL1* gene in tomato increases fruit yield and enhances K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selectivity under salt stress. *Plant Cell Environ.* **24**, S. 875-880
- SALAMA, F.M., KHODARY, S.E.A. und HEIKAL, M.M. (1981): Effect of Soil Salinity and IAA on Growth, Photosynthetic Pigments, and Mineral Composition of Tomato and Rocket Plants. *Phyton* **21**(2), S. 177-188
- SALEH, S.A.A., HEUBERGER, H. und SCHNITZLER, W.H. (2003): Effect of Nutrients and *Bacillus subtilis* on Salinity Tolerance of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). 40. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, Freising-Weihenstephan, 26.02-01.03.2003. BDGL-Schriftenreihe, Band 21, S. 47
- SCHACHTSCHABEL, P., BLUME, H.-P., BRÜMMER, G., HARTGE, K.H., SCHWERTMANN, U. unter Mitarbeit von AUERSWALD, K., BEYER, L., FISCHER, W.R., KÖGEL-KNABNER, I., RENGGER, M. und STREBEL, O., (1998): Versalzung. In: SCHEFFER, F. und SCHACHTSCHABEL, P. (Hrsg.) Lehrbuch der Bodenkunde, 14. Auflage. Stuttgart, Enke, S. 391
- SCHLENK, H. und GELLERMAN, J.L. (1960): Esterification of Fatty Acids with Diazomethane on a Small Scale. *Anal. Chem.* **32**(11), S. 1412-1414
- SCHMIEDEKNECHT, G. (1993): Biologische Bekämpfung von *Rhizoctonia solani* Kühn an Kartoffelpflanzen durch mikrobielle Antagonisten. *Arch. Phytopathol. Pflanzensch.* **28**, S. 311-320
- SCHMIEDEKNECHT, G., BOCHOW, H. und JUNGE, H. (1994): Biologische Bekämpfung bodenbürtiger Schaderreger bei Kartoffeln. *Mitt. a.d. Biol. Bundesanstalt f. Land- und Forstwirtschaft* **301**, S. 371
- SCHMIEDEKNECHT, G., BOCHOW, H. und JUNGE, H. (1996): Biologischer Pflanzenschutz bei Kartoffeln. *Mitt. a.d. Biol. Bundesanstalt f. Land- und Forstwirtschaft* **321**, S. 467
- SCHMIEDEKNECHT, G., BOCHOW, H. und JUNGE, H. (1998): Use of *Bacillus subtilis* as

- biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **105**(4), S. 376-386
- SCHMIEDEKNECHT, G., JUNGE, H. und BOCHOW, H. (1995): Biologische Bekämpfung bakterieller und pilzlicher Erkrankungen bei Kartoffeln. *Phytomedizin* **25**(3), S. 32-33
- SCHMIEDEKNECHT, G., ISSOUFOU, I., JUNGE, H. und BOCHOW, H. (2001): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. V. Biological control of diseases on maize and sunflowers. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **108**(5), S. 500-512
- SCHNEIDER, E.A., GIBSON, R.A. und WIGHTMAN, F. (1972): Biosynthesis and Metabolism of Indol-3-yl-acetic Acid I. The native indoles of barley and tomato shoots. *J. Exp. Bot.* **23**(74), S. 152-170
- SCHÖNBECK, F. und KRASKA, T. (1994): Induced resistance: mechanisms and application. *Plant Science (Sofia)* **31**(7), S. 236-238
- SCHÖNBECK, F., STEINER, U. und KRASKA, T. (1993): Induzierte Resistenz: Kriterien, Mechanismen, Anwendung und Bewertung. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **100**(5), S. 541-557
- SCHUSTER, E. (2005): Persönliche Mitteilung
- SEAL, A., HAZRA, A., NAG, R., CHAUDHURI, S. und DASGUPTA, M. (2001): Exogenous auxin depletion renders an *Arachis hypogea* suspension culture sensitive to water loss without affecting cell growth. *Plant Cell Rep.* **20**, S. 567-573
- SHALATA, A. und NEUMANN, P.M. (2001): Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* **52**(364), S. 2207-2211
- SHANNON, M.C., GRONWALD, J.W. und TAL, M. (1987): Effects of Salinity on Growth and Accumulation of Organic and Inorganic Ions in Cultivated and Wild Tomato Species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **112**(3), S. 416-423
- SNEATH, P.H.A (1986): Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: SNEATH, P.H.A, MAIR, N.S., SHARPE, M.E. und HOLT, J.G. (Hrsg.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Band 2. Williams & Wilkins, S. 1104-1207
- STEINER, U., OERKE, E.-C. und SCHÖNBECK, F. (1988): Zur Wirksamkeit der induzierten Resistenz unter praktischen Anbaubedingungen IV. Befall und Ertrag von Wintergerstensorten mit induzierter Resistenz und nach Fungizidbehandlung. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **95**(5), S. 506-517
- TAIZ, L. und ZEIGER, E. (2000): *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akad. Verl., S. 773

- WATAD, A.-E.A., REUVENI, M., BRESSAN, R.A. und HASEGAWA, P.M. (1991): Enhanced Net K<sup>+</sup> Uptake Capacity of NaCl-Adapted Cells. *Plant. Physiol.* **95**, S. 1265-1269
- WIGHTMAN, F. und LIGHTY, D.L. (1982): Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiol. Plant.* **55**, S. 17-24
- WITTMANN, J. und SCHÖNBECK, F. (1996): Studies of tolerance induction in wheat infested with powdery mildew or aphids. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **103**(3), S. 300-309
- XIONG, L. und ZHU, J.-K. (2004): Salt Tolerance. In: SOMERVILLE, C.R. und MEYEROWITZ, E.M. (Hrsg.) *The Arabidopsis Book*. Rockville, MD, American Soc. of Plant Biologists, doi/10.1199/tab.0048, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>, gefunden am 14.04.2004
- ZIMMER, J., ISSOUFOU, I., SCHMIEDEKNECHT, G. und BOCHOW, H. (1998): Population dynamics of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent under controlled conditions. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, **63**/2b, S. 489-495
- ZIMMER, J., TIGGES, J. und BOCHOW, H. (1999): Increasing salt tolerance in vegetables by root bacterization with *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. *Proc. First Regional Symposium for Applied Biological Control in Mediterranean Countries*, Cairo, Egypt, October 25-29, 1998. Canard M. & Beyssat-Arnaouty V. (Hrsg.) Toulouse, France, S. 259-263

## **9.2 Abkürzungsverzeichnis**

ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
BAP	6-Benzylaminopurin
BER	Blütenendfäule
BF	Blattfläche
cfu	colony forming units
2,4D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	electrical conductivity
ELISA	enzyme linked immuno sorband assay
FZB	Forschungszentrum für Biotechnologie
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	high performance liquid chromatography
HSD	honest significant difference
HUB	Humboldt-Universität zu Berlin
IAA	Indol-3-essigsäure, Auxin
IAAld	Indol-3-acetaldehyd
IAA-ME	Indol-3-essigsäure-Methylester
IAM	Indol-3-acetamid
IAN	Indol-3-acetonitril
IAOX	Indol-3-acetaldoxim
IPyA	Indol-3-pyruvat
ISR	induced systemic resistance
KF	Kulturfiltrat(e)
NAA	Naphthylessigsäure
PE	Peptidextrakt
PEG	Polyethylenglycol
PGPR	plant growth-promoting rhizobacteria

PR	pathogenesis-related
RAMIG	Rabbit Anti Mouse Immunglobolin
rpm	revolutions per minute
SAR	systemic acquired resistance
SFM	Sprossfrischmasse
SL	Sprosslänge
STM	Sprosstrockenmasse
TAM	Tryptamin
TEAA	Triethylaminessigsäure
TM	Trockenmasse
TRP	Tryptophan
WFM	Wurzelfrischmasse
WL	Wurzellänge
WTM	Wurzeltrockenmasse

### **9.3 Tabellenverzeichnis**

- Tab. 1: Peptidfraktionierung der Kulturfiltrate von FZB24 und Peptidgehalte der Kulturfiltrate und der daraus entstandenen Fraktionen
- Tab. 2: Wirkung einer Wurzelapplikation des Kulturfiltrats-Übergangsphase von FZB24 auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 3: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 8-13 und 14-16 von FZB24 auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 4: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 12-18, 19-25, 26-31 und 32-36 von FZB24 auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 5: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 37-41 und batch-50 von FZB24 auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 6: Wirkung einer Wurzelapplikation des Peptidextraktes von FZB41 auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 7: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 8: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptamin und Indol-3-acetamid auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 9: Wirkung einer Blattapplikation von Tryptophan und Indol-3-pyruvat auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 10: Wirkung einer Blattapplikation von Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 11: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Adventivwurzelbildung von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen bei 0 mM NaCl
- Tab. 12: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Adventivwurzelbildung von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Tab. 13: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf das Wachstum von Tomatensämlingen bei 100 mM NaCl

#### **9.4 Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 1: Peptidfraktionierung des Kulturfiltrats aus der Übergangsphase von FZB24
- Abb. 2: Wirkung einer Wurzelapplikation des Kulturfiltrats-Übergangsphase von FZB24 auf die Blattfläche von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 3: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 8-13 und 14-16 von FZB24 auf die Wurzellänge von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 4: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 12-18, 19-25, 26-31 und 32-36 von FZB24 auf die Sprosstrockenmasse von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 5: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 12-18, 19-25, 26-31 und 32-36 von FZB24 auf die Wurzelfrischmasse von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 6: Wirkung einer Wurzelapplikation der Kulturfiltrat-Fractionen 37-41 und batch-50 von FZB24 auf die Wurzellänge von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 7: Wirkung einer Wurzelapplikation des Peptidextraktes von FZB41 auf die Sprosstrockenmasse von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 8: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzellänge von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 9: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzeltrockenmasse von Tomatensämlingen 150 mM NaCl
- Abb. 10: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt des Apex von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 11: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt der Blätter von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 12: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt des Stängels von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 13: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-

acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt der Wurzel von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl

- Abb. 14: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptamin und Indol-3-acetamid auf die Blattfläche von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl und insgesamt 15-tägiger Kulturdauer
- Abb. 15: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptamin und Indol-3-acetamid auf die Wurzelfrischmasse von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 16: Wirkung einer Blattapplikation von Tryptophan und Indol-3-pyruvat auf die Blattfläche von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 17: Wirkung einer Blattapplikation von Tryptophan und Indol-3-pyruvat auf die Wurzelfrischmasse von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 18: Wirkung einer Blattapplikation von Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Sprosstrockenmasse von Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 19: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Bewurzelungsrate von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen bei 0 mM NaCl
- Abb. 20: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Bewurzelungsrate von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach bei 150 mM NaCl
- Abb. 21: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzelanzahl von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen bei 0 mM NaCl
- Abb. 22: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzelanzahl von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen bei 150 mM
- Abb. 23: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzellänge von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen bei 0 mM NaCl
- Abb. 24: Wirkung von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzellänge von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen nach bei 150 mM NaCl
- Abb. 25: Wirkung von Indol-3-pyruvat und Indol-3-essigsäure auf den Indol-3-essigsäure-Gehalt von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen bei 0 mM



- Abb. 26: Wirkung von Indol-3-pyruvat und Indol-3-essigsäure auf den Indol-3-essigsäure-Gehalt von Hypokotylsegmenten aus Tomatensämlingen bei 150 mM NaCl
- Abb. 27: Gewächshausversuch
- Abb. 28: Versuchsanstellung im Gewächshaus
- Abb. 29: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Blattfläche von Tomatensämlingen bei 100 mM NaCl
- Abb. 30: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf die Wurzeltrockenmasse von Tomatensämlingen bei 100 mM NaCl
- Abb. 31: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt des Sprosses von Tomatensämlingen bei 100 mM NaCl
- Abb. 32: Wirkung einer Wurzelapplikation von Tryptophan, Indol-3-pyruvat, Indol-3-acetaldehyd und Indol-3-essigsäure auf den Wassergehalt der Wurzel von Tomatensämlingen bei 100 mM NaCl
- Abb. 33: Tryptophan-abhängige Biosynthesewege der Indol-3-essigsäure

### **Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe, dass mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist und dass ich weder früher noch gleichzeitig die Anmeldung der Promotionsabsicht an einer anderen Hochschule oder an einem anderen Fachbereich beantragt habe.

Berlin, den

### **Danksagungen**

Ich bedanke mich bei Prof. em. Dr. Dr. h.c. Helmut Bochow für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung, Dr. Klaus-Dieter Hentschel für die intensive Betreuung und Hilfsbereitschaft und Dr. Stefan Dolej für die Einweisung in die Methodik, sowie den Mitarbeitern des Fachgebiets Phytomedizin für das angenehme Arbeitsklima.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. habil. agr. Bernd Freier für die Begutachtung dieser Arbeit, sowie der FAZIT-Stiftung und dem Berliner Programm zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre für die finanzielle Unterstützung.